

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

TIAGO TEDESCHI DOS SANTOS

DESENVOLVIMENTO DA MUCOSA INTESTINAL E IMUNIDADE DE
FRANGOS DE CORTE ALIMENTADOS COM DIETAS DE BAIXA E
ALTA CONCENTRAÇÃO DE FIBRA E BETAINA

CURITIBA

2017

TIAGO TEDESCHI DOS SANTOS

DESENVOLVIMENTO DA MUCOSA INTESTINAL E IMUNIDADE DE
FRANGOS DE CORTE ALIMENTADOS COM DIETAS DE BAIXA E
ALTA CONCENTRAÇÃO DE FIBRA E BETAINA

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Fisiologia, área de concentração em Fisiologia Animal Comparativa e dos Animais Domésticos, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Fisiologia.

Orientadora: Prof. Dra. Ana Vitória Fischer da Silva.

CURITIBA

2017

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Carla Fabiane Rasmussen – CRB/9-940)

Santos, Tiago Tedeschi dos.

Desenvolvimento da mucosa intestinal e imunidade de frangos de corte alimentados com dietas de baixa e alta concentração de fibra e betaina. / Tiago Tedeschi dos Santos. – Curitiba, 2017.

117 f.: il. ; 30cm.

Orientadora: Ana Vitória Fischer da Silva.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia.

1. Betaina. 2. Fibras. 3. Frango de corte. 4. Mucosa intestinal. I. Título II. Silva, Ana Vitória Fischer da. III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia.

CDD (20. ed.) 591.1



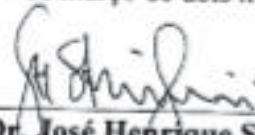
Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Departamento de Fisiologia
Programa de Pós-Graduação em Fisiologia



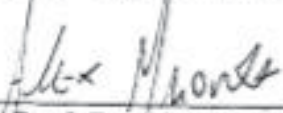
Ata da Defesa de Tese de Doutorado de Tiago Tedeschi dos Santos

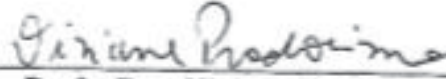
Aos vinte e sete dias do mês de março do ano de dois mil e dezoito, foi realizada no auditório do Departamento de Fisiologia no Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, a defesa de tese do doutorando **TIAGO TEDESCHI DOS SANTOS**, intitulada **"DESENVOLVIMENTO DA MUCOSA INTESTINAL E IMUNIDADE DE FRANGOS DE CORTE ALIMENTADOS COM DIETAS DE BAIXA E ALTA CONCENTRAÇÃO DE FIBRA E BETAÍNA"**. A abertura teve início às 09h00min pela Presidente da Banca Examinadora e Orientadora do candidato, Professora Doutora Ana Vitória Fischer da Silva. A Presidente apresentou ao público presente os membros da banca examinadora e logo passou à palavra ao aluno, para que fizesse uma apresentação sucinta de sua tese. Após a explanação oral, a Professora Doutora Ana Vitória Fischer da Silva passou à palavra ao primeiro examinador, Professor Doutor José Henrique Stringhini do departamento de Produção Animal da Escola Veterinária da Universidade Federal de Goiás (UFG). Na sequência, passou à palavra a segunda examinadora, Professora Doutora Chayane da Rocha do Departamento Zootecnia da Universidade Federal do Paraná (UFPR). Em seguida passou a palavra ao terceiro examinador, Professor Doutor Alex Maiorka do Departamento Zootecnia da Universidade Federal do Paraná (UFPR) e por último passou à palavra a quarta examinadora Professora Doutora Viviane Prodócimo, do Departamento de Fisiologia da UFPR. O aluno respondeu as perguntas dos examinadores e se posicionou frente às críticas. Findas as arguições pelos demais membros da banca, a Presidente, Professora Doutora Ana Vitória Fischer da Silva fez uma rápida apreciação das conclusões mais importantes dos debates realizados e comunicou que a Banca Examinadora iria reunir-se em sessão secreta para discussão e atribuição dos conceitos. Os trabalhos foram interrompidos por cinco minutos. Após haver analisado o referido trabalho e arguido o candidato, os membros da banca examinadora reunidos em sessão secreta deliberaram pela **"APROVAÇÃO"**, habilitando-o ao título de Doutor em Fisiologia, condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora e ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Art. 59º do Regimento interno deste Programa de Pós-Graduação e no Art. 61º do Regimento interno deste Programa de Pós-Graduação. Eu, Professora Doutora Ana Vitória Fischer da Silva, Presidente da Banca Examinadora lavrei a presente ata, da qual assino juntamente com os senhores examinadores.

Curitiba, 27 de março de dois mil e dezoito.


Prof. Dr. José Henrique Stringhini
UFG - Membro Titular


Prof. Dra. Chayane da Rocha
UFPR - Membro Titular


Prof. Dr. Alex Maiorka
UFPR - Membro Titular


Prof. Dra. Viviane Prodócimo
UFPR - Membro Titular


Prof. Dra. Ana Vitória Fischer da Silva
UFPR - Orientadora e Presidente da Banca Examinadora

PARECER

Os abaixo-assinados, membros da Banca Examinadora da Defesa de Tese de Doutorado, a qual se submeteu **TIAGO TEDESCHI DOS SANTOS** para fins de obter o título de Doutor em Fisiologia pela Universidade Federal do Paraná, são de parecer a APROVAÇÃO (aprovação/reprovação) do acadêmico.

A obtenção do título está condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora e ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Regimento interno deste Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 27 de março de 2018.

Parecer (Aprovada/Reprovada)	Nome	Assinatura
Aprovado	Prof. Dr. José Henrique Stringhini UFG - Membro Titular	<i>J. Stringhini</i>
Aprovado	Profa. Dra. Chayane da Rocha UFPR - Membro Titular	<i>Chayane da Rocha</i>
Aprovado	Prof. Dr. Alex Maiorka UFPR - Membro Titular	<i>Alex Maiorka</i>
Aprovado	Profa. Dra. Viviane Prodocimo UFPR - Membro Titular	<i>Viviane Prodocimo</i>
Aprovado	Profa. Dra. Ana Vitória Fischer da Silva UFPR - Orientadora e Presidente da Banca Examinadora	<i>Ana Vitória Fischer da Silva</i>

“...Rumores de felicidade

Canções e flores pela estrada...”

Hino do Estado do Paraná

RESUMO

Um total de 250 frangos de corte Cobb 500 com 1 dia de foram alocados em 16 gaiolas com 15 frangos cada. Os tratamentos consistiam de duas formulações com baixa ou alta concentração de fibra e 4 níveis de adição de betaina (0, 1, 3 e 5 kg/ton) em um delineamento fatorial 2x4. No alojamento, 10 aves foram pesadas e eutanaziadas para determinação de padrão experimental no momento anterior ao fornecimento das rações. Aos 4, 9 e 14 dias, 10 aves por tratamento foram retiradas, pesadas e eutanaziadas para avaliações de: peso do intestino, saco vitelínico, pâncreas e fígado em relação ao peso da ave; duodeno foi coletado para determinação de altura de vilosidade, profundidade de cripta, número de células em replicação e número de células caliciformes. O conteúdo intestinal foi coletado para determinação de osmolalidade e concentração de ácido siálico. Sangue foi coletado para determinação da população de leucócitos e osmolalidade plasmática e amostras de jejuno para determinação de expressão gênica de proteínas de junção "Tight" (claudina 1, claudina 5 e ocludina) e interleucina 2. Dados foram analisados por ANOVA em desenho completamente ao acaso considerando inclusão de betaina, concentração de fibra e idade como fatores principais. Quando efeitos foram considerados significantes ($P < 0,05$), médias foram separadas usando o teste de significância de Tukey. O peso do saco vitelínico reduziu ($P < 0,05$) entre a eclosão e 4 dias e entre 4 e 14 dias, o número de células caliciformes e de enterócitos em mitose foram menores em aves aos 14 dias ($P < 0,05$), enquanto o tamanho da vilosidade aumentou ($P < 0,05$) durante todo o período analisado e a profundidade de cripta aumentou ($P < 0,05$) entre eclosão e 4 dias e entre 4 e 14 dias, suportando o desenvolvimento do trato gastrointestinal nesse período inicial. Aves aos 4 e 9 dias de idade apresentaram maior ($P < 0,05$) número de vilos fusionados em comparação com aves à eclosão e 14 e aves aos 4 dias apresentaram maior ($P < 0,05$) osmolalidade do conteúdo intestinal comparado com aves aos 9 e 14 dias. A secreção de ácido siálico foi maior ($P < 0,05$) aos 4 dias em comparação com aves aos 9 dias, posteriormente reduzindo aos 14 dias e a expressão de interleucina 2 apresentou uma tendência ($P < 0,06$) de aumentar entre a eclosão e 4 dias e reduzindo ($P < 0,05$) aos 9 dias, caracterizando um efeito inflamatório temporário. As aves que receberam betaina apresentaram menor ($P < 0,05$) osmolalidade do conteúdo intestinal e menores números de células caliciformes e de células em mitose. Vilos de aves que receberam betaina apresentaram maior ($P < 0,05$) tamanho e menor ($P < 0,05$) espessura. A expressão de genes de Claudina 5 e ocludina reduziu ($P < 0,05$) em aves alimentadas com betaina independente da idade. Aves que receberam ração com maior concentração de fibra apresentaram aumento ($P < 0,05$) na altura da vilosidade e menor ($P < 0,05$) número de células caliciformes independente da idade. O fornecimento de fibra e betaina reduziu o efeito inflamatório inicial gerado pela presença de ração no trato gastrointestinal e estimulou o desenvolvimento e adaptação do trato gastrointestinal entre a eclosão e 14 dias de vida.

Palavras-chave: Betaina, Fibra, Frango de corte, Intestino

ABSTRACT

A total of 250 broilers Cobb 500 were allocated at 16 cages with 15 birds each at day of hatch. Treatments were represented by two feed formulation with low or high fibre concentration and 4 levels of betaine inclusion (0, 1, 3 or 5kg/tonne) in a factorial design 2x4. At house, 10 broilers that were not distributed in the cages were weight and euthanized by cervical dislocation for standard reference before the feed supply. At 4, 9 and 14 days of age, 10 birds per treatment were selected weight and euthanized. Intestine, pancreas, liver and yolk sac weight was determined as a proportion of the animal weight, duodenum samples were collected for villus height and width, crypt depth and number of enterocyte cells in replication and calciform cells at the centre of the villus. Intestinal content was collected for determination of the osmolality and sialic acid concentration and blood samples collected for determination of the leukocyte population and plasmatic osmolality. Jejunal samples were collected for gene expression of "Tight" junction proteins (claudin 1 and 5, and occludin) and interleukine 2. Data were subjected to least squares ANOVA for a completely randomized design in a three-way interaction considering age, non-starch polysaccharide content of the diet and betaine inclusion. Each animal served as the experimental unit. When the effects were found to be significant ($P < 0.05$), treatment means were separated using Tukey's Significant Difference test. The weight of the yolk sac reduced ($P < 0.05$) between hatch and 4 days and between 4 and 14 days, number of calciform cells and cells in mitosis at the villus were lower ($P < 0.05$) at 14 days of age while villus height increased ($P < 0.05$) during all period and crypt depth increased ($P < 0.05$) between hatch 4 and 14 days, supporting the development of the gastrointestinal tract after hatch. At 4 and 9 days of age birds had more ($P < 0.05$) fused villus than at hatch and 14 days and at 4 days had higher ($P < 0.05$) digesta osmolality compared with 9 and 14 days. Sialic acid secretion was higher ($P < 0.05$) at 4 days compared to 9 days and further reduced ($P < 0.05$) at 14 days and the gene expression of interleukine 2 had a trend ($P < 0.06$) to increase between hatch and 4 days, reducing ($P < 0.05$) at 9 days supporting that animals at these ages passed through a proinflammatory status. Birds fed diets with betaine had lower ($P < 0.05$) digesta osmolality, number of calciform cells and cells in mitosis. Villus of birds fed diets included with betaine were bigger ($P < 0.05$) and had smaller ($P < 0.05$) width. Gene expression for Claudin 5 and Occludin reduced ($P < 0.05$) in birds fed betaine independent of the age. Broilers fed high fibre diet presented higher ($P < 0.05$) villus and lower ($P < 0.05$) number of calciform cells independent of the age. Formulation of diets with high fibre and/or betaine reduce the inflammatory status generated by the presence of feed in the intestinal tract of broilers and stimulates the gut development and adaptation of broilers between hatch and 14 days of age.

Keywords: Betaine, Broiler, Fibre, Intestine

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 2.1 – ESQUEMA GERAL DA SUPERFÍCIE INTERNA DO INTESTINO, MOSTRANDO VILOS, CRIPTAS E PROCESSO DE EXTRUSÃO	4
FIGURA 2.2 – DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO DE FRANGOS DE CORTE AOS 2 (A) E 19 (B) DIAS DE INCUBAÇÃO DEMONSTRANDO A FORMAÇÃO DE VASOS INTRA (A-1) E EXTRA (A-2) EMBRIONÁRIOS E O PROCESSO DE INTERNALIZAÇÃO DO SACO DA GEMA (B).....	5
FIGURA 2.3 – DESENVOLVIMENTO INTESTINAL DE EMBRIÕES DE CODORNAS ENTRE 6 (E6) E 16 (E16) DIAS DE INCUBAÇÃO. É POSSÍVEL OBSERVAR A FORMAÇÃO DOS VILOS A PARTIR DO 14 DIA DE INCUBAÇÃO E FORMAÇÃO DAS CAMADAS MUSCULARES EXTERNAS (O) E INTERNAS (I) CIRCULARES (C) E LONGITUDINAIS (L) A PARTIR DO 16 DIA DE INCUBAÇÃO	7
FIGURA 2.4 – CONTEÚDO DE COMPONENTES E TECIDOS (EM % DO PESO VIVO) DE FRANGOS DE CORTE ENTRE 1 E 10 SEMANAS DE VIDA	13
FIGURA 2.5 – ABUNDANCIA E PRINCIPAIS ESPÉCIES DE BACTÉRIAS ENCONTRADAS NO TRATO GASTROINTESTINAL DE FRANGOS DE CORTE...	19
FIGURA 2.6 – MODELO DA PAREDE CELULAR VEGETAL DEMONSTRANDO A PRESENÇA DE FIBRAS DE CELULOSE ENTREMEDADAS POR POLISACARÍDEOS NÃO AMÍDICOS.....	24
FIGURA 2.7 – ESTRUTURA QUÍMICA DA BETAÍNA CONTENDO TRÊS GRUPOS METILA (CH ₃).....	30
FIGURA 2.8 – METABOLISMO DA BETAÍNA.....	35

FIGURA 2.9 – PERCENTUAL DE PROPORÇÃO DE PRESENÇA DE CARBONO EM DIFERENTES FRAÇÕES (AQUOSA, LIPÍDICA E PROTÉICA) DE JEJUNO, MUSCULO CARDÍACO E FÍGADO DE FRANGOS DE CORTE 24 HORAS APÓS ALIMENTAÇÃO COM BETAÍNA, COLINA E METIONINA CONTENDO CARBONO MARCADO**37**

FIGURA 3.1 – VILLUS HEIGHT (VH) AND CRYPT DEPTH (CP) OF BROILERS WITH 14 DAYS OF AGE.....**50**

FIGURA 3.2 – VILLUS OF BROILERS WITH 4 DAYS OF AGE. A) REPRESENTS A REGULAR VILLUS WHILE B) REPRESENTS A VILLUS CLASSIFIED AS FUSED ...**51**

FIGURA 3.3 – VILLUS OF BROILERS WITH 4 DAYS (1) AND 9 DAYS (2) OF AGE. A) REPRESENTS A REGULAR VILLUS WHILE B) REPRESENTS A VILLUS CLASSIFIED AS FUSED**52**

FIGURA 3.4 – VILLUS OF BROILERS AT 4 DAYS OF AGE. THE YELLOW LINE REPRESENTS A 200 MICROMETER DISTANCE. CELL WITH POSITIVE REACTION FOR KI-67 ANTIBODY ARE REPRESENTED BY DARK NUCLEOUS AS INDICATED BY BLACK ARROWS**53**

FIGURA 3.5 – DUODENUM SAMPLES, EVALUATED BY STAINING MICROSCOPY, OF BROILERS FED LOW FIBRE DIETS WITH 0 (A) OR 5 (B) KG OF BETAINE/ TONNE OR HIGH FIBRE DIET WITH 0 (C) OR 5 (D) KG OF BETAINE/TONNE AT HATCH, 4, 9 AND 14 DAYS OF AGE. FIGURES FOR HATCH ARE THE SAME FOR ALL TREATMENTS. WHITE BARS IN THE CENTRE BOTTOM OF EACH FIGURE REPRESENTS 200UM**59**

FIGURA 3.6 – DUODENUM SAMPLES, EVALUATED BY SCANNING ELECTRON MICROSCOPY, OF BROILERS FED LOW FIBRE DIET WITH 0 (A) OR 5 (B) KG OF BETAINE/TONNE OR HIGH FIBRE DIET WITH 0 (C) OR 5 (D) KG OF BETAINE/TONNE AT HATCH, 4, 9 AND 14 DAYS OF AGE. FIGURES FOR HATCH ARE THE SAME FOR ALL TREATMENTS**60**

FIGURA 4.1 – VILLUS OF BROILERS WITH 0 (A), 4 (B), 9 (C) AND 14 (D) DAYS OF AGE. THE YELLOW LINE REPRESENTS A 200 MICROMETERS DISTANCE. CALICIFORM CELLS REPRESENTED BY DARK CELLS AS INDICATED BY WHITE ARROWS**68**

FIGURA 4.2 – MEAN (STANDARD ERROR OF THE MEAN) ¹ OF THE INTERACTION BETWEEN FIBRE CONTENT AND BETAINE INCLUSION ON THE SIALIC ACID SECRETION IN THE DIGESTA OF BROILERS BETWEEN 4 AND 14 DAYS OF AGE FED HIGH ² OR LOW³ FIBRE DIETS WITH DIFFERENT INCLUSIONS OF BETAINE**71**

LISTA DE TABELAS

TABELA 2.1 – COMPOSIÇÃO FIBROSA (%) CONFORME METODOLOGIA DE DETERMINAÇÃO DE FIBRA BRUTA, FIBRA EM DETERGENTE NEUTRO (FDN), FIBRA EM DETERGENTE ÁCIDO (FDA) E COMPOSIÇÃO DE POLISACARÍDEOS NÃO AMILÁCEOS TOTAIS E SOLÚVEIS (SOL) DE MILHO, FARELO DE SOJA E FARELO DE ARROZ	23
TABELA 3.1 – PROXIMATE ANALYSIS RESULTS, BETAINE AND NON STARCH POLYSACCHARIDES COMPOSITION OF CORN, SOYBEAN MEAL AND RICE BRAN USED IN FEED FORMULATION	47
TABELA 3.2 – DIET FORMULATION	48
TABELA 3.3 – PROXIMATE ANALYSIS AND BETAINE CONTENT ANALYZED IN FEED SAMPLES	49
TABELA 3.4 – INTESTINAL LENGTH (CM) AND RELATIVE WEIGHT (% BODY WEIGHT) OF YOLK SAC, INTESTINE, LIVER AND PANCREAS OF BROILERS AT HATCH, 4, 9 AND 14 DAYS OF AGE FED LOW AND HIGH FIBRE DIET INCLUDED WITH 0, 1, 3 OR 5 KG OF BETAINE/TONNE OF FEED ¹	55
TABELA 3.5 – VILLUS HEIGHT AND WIDTH (UM), CRYPT DEPTH (UM), VILLUS/CRYPT RATION AND ABSORPTIVE AREA (UM ²) OF THE DUODENUM OF BROILERS AT HATCH, 4, 9 AND 14 DAYS OF AGE FED LOW AND HIGH FIBRE DIET INCLUDED WITH 0, 1, 3 OR 5 KG OF BETAINE/TONNE OF FEED	56
TABELA 3.6 – PROPORTION OF FUSED VILLUS (%) AND NUMBER OF ENTEROCYTES CELLS WITH POSITIVE REACTION FOR KI-67 ANTIBODY (CELLS/200UM) IN THE CENTER OF THE VILLUS IN THE DUODENUM OF BROILERS	57
TABELA 4.1 – MEAN (STANDARD ERROR OF THE MEAN) ¹ CALICIFORM CELLS COUNT (NUMBER OF CALICIFORM CELLS/200 MICROMETERS) OF DUODENUM	

SAMPLES AND SIALIC ACID SECRETION (MG/KG DRY MATTER) OF BROILERS AT HATCH, 4, 9 AND 14 DAYS OF AGE FED LOW AND HIGH FIBRE DIET INCLUDED WITH 0, 1, 3 OR 5 KG OF BETAIN/TONNE OF FEED	70
--	----

TABELA 4.2 – PEARSON CORRELATION BETWEEN SIALIC ACID SECRETION (SAS), CALICIFORM CELL COUNT (CCC), PLASMA (PO) AND DIGESTA OSMOLALITY (DO) OF BROILERS BETWEEN HATCH AND 14 DAYS OF AGE FED LOW ² AND HIGH ³ FIBRE DIET INCLUDED WITH 0, 1, 3 OR 5 KG OF BETAIN/TONNE OF FEED	71
--	----

TABELA 5.1 – PRIMERS USED FOR REAL-TIME PCR	80
--	----

TABELA 5.2 – CLAUDIN 1, CLAUDIN 5, OCCLUDIN AND INTERLEUKIN 2 GENE EXPRESSION (LOG OF THE PROPORTION OF GADPH EXPRESSION) ON JEJUNAL SAMPLES OF BROILERS AT HATCH, 4 AND 9 DAYS OF AGE	81
---	----

TABELA 5.3 – CLAUDIN 1, CLAUDIN 5, OCCLUDIN AND INTERLEUKIN 2 GENE EXPRESSION (LOG OF THE PROPORTION OF GADPH EXPRESSION) ON JEJUNAL SAMPLES OF BROIELRS AT 4 AND 9 DAYS OF AGE AND FED DIETS WITH DIFFERENT FIBRE CONCENTRATIONS AND BETAIN/TONNE OF FEED INCLUDED	87
--	----

TABELA 5.4 – LEUKOCYTE POPULATION DETERMINED BY FLOW CITOMETRY (LOG OF THE PROPORTION OF THE POPULATION) ON BLOOD SAMPLES OF BROIELRS AT HATCH, 4 AND 9 DAYS OF AGE AND FED DIETS WITH DIFFERENT FIBRE CONCENTRATION AND BETAIN/TONNE OF FEED INCLUDED	88
---	----

TABELA 5.5 – INTERACTION BETWEEN BROILERS AGE AND BETAIN/TONNE OF FEED INCLUDED IN THE LEUKOCYTE POPULATION DETERMINED BY FLOW CITOMETRY (LOG OF THE PROPORTION OF THE POPULATION) ON BLOOD SAMPLES.....	89
---	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 DESENVOLVIMENTO INICIAL DO TRATO GASTROINTESTINAL DE FRANGOS DE CORTE	3
2.1.1 Caracterização do trato gastrointestinal da ave adulta.....	3
2.1.2 Desenvolvimento embrionário do trato gastrointestinal.....	4
2.1.3 Desenvolvimento e adaptação pós eclosão	8
2.1.4 Desenvolvimento inicial e desempenho de frangos de corte.....	11
2.2 O SISTEMA IMUNE DAS AVES COM FOCO NO TRATO GASTROINTESTINAL	13
2.2.1 Sistema imune.....	13
2.2.2 Órgãos linfóides primários.....	14
2.2.3 Órgãos linfóides secundários	15
2.2.4 Leucócitos	15
2.2.5 Imunidade natural ou inespecífica.....	17
2.2.6 Resposta inflamatória.....	20
2.3 UTILIZAÇÃO DE FIBRA NA NUTRIÇÃO DE FRANGOS DE CORTE	21
2.3.1 Determinação do conteúdo de fibra	21
2.3.2 Classificação de tipos de fibras	23
2.3.3 Efeito da fibra no desempenho de frangos de corte.....	25
2.3.4 Farelo de arroz	29
2.4 BETAÍNA NA NUTRIÇÃO DE AVES.....	30
2.4.1 Betaína: estrutura e classificação.....	30
2.4.2 Farmacologia da betaína.....	31
2.4.3 Funções da betaína no metabolismo animal	33
2.4.3.1 Betaína como doador de grupos metila.....	33
2.4.3.2 Betaína como composto osmoprotetor.....	37
3 INFLUENCE OF FIBRE AND BETAINE ON THE DEVELOPMENT OF THE GASTROINTESTINAL TRACT OF BROILERS BETWEEN HATCH AND 14 DAYS OF AGE.....	43
3.1 ABSTRACT	43

3.2 INTRODUCTION	43
3.3 MATERIALS AND METHODS.....	46
3.3.1 Birds and experimental design	46
3.3.2 Diets and experimental products	46
3.3.3 Animal performance	49
3.3.4 Sample collection and morphometry	49
3.3.5 Villus height, villus width, crypt depth and superficie area	50
3.3.6 Proportion of fused villus	51
3.3.7 Number of cells in mitosis.....	52
3.3.8 Scanning electron microscopy.....	53
3.3.9 Statistical analysis	54
3.4 RESULTS.....	54
3.4.1 Intestine, liver, pancreas and yolk sac morphometry.....	54
3.4.2 Villus morphometry, crypt dept and absorption area of duodenum	56
3.4.3 Fused villus and cells in mitosis	57
3.5 DISCUSSION	58
3.6 CONCLUSION	63
4 INFLUENCE OF FIBRE AND BETAINE ON MUCUS PRODUCTION AND DIGESTA AND PLASMA OSMOLALITY OF BROILERS FROM HATCH TO 14 DAYS OF AGE.....	64
4.1 ABSTRACT	64
4.2 INTRODUCTION.....	64
4.3 MATERIALS AND METHODS.....	66
4.3.1 Sample collection	67
4.3.2 Plasma and digesta osmolality	67
4.3.3 Sialic acid secretion.....	67
4.3.4 Number of caliciform cells	68
4.3.5 Statistical analysis	69
4.4 RESULTS.....	69
4.4.1 Plasma and digesta osmolality	69
4.4.2 Caliciform cells count.....	69
4.4.3 Sialic acid secretion.....	70
4.5 DISCUSSION	71
4.6 CONCLUSION	75

5 IMMUNE PROFILE OF BROILERS BETWEEN HATCH AND 9 DAYS OF AGE FED DIETS WITH DIFFERENT BETAINES AND FIBRE CONCENTRATIONS.....	76
5.1 ABSTRACT	76
5.2 INTRODUCTION.....	76
5.3 MATERIALS AND METHODS.....	78
5.3.1 Sample collection	78
5.3.2 Flow cytometry analysis	78
5.3.3 Claudin, Occludin and Interleukin 2 gene expression.....	79
5.3.4 Statistical analysis	80
5.4 RESULTS.....	80
5.4.1 Claudin, Occludin and Interleukin 2 gene expression.....	80
5.4.2 Leukocyte population in peripheral blood	81
5.5 DISCUSSION	82
6 DISCUSSÃO	90
7 CONCLUSÃO	92
8 CONSIDERAÇÕES FINAIS	93
9 REFERÊNCIAS.....	95

1 INTRODUÇÃO

Devido a avanços relacionados às diversas áreas da produção como, genética, nutrição e manejo, a idade necessária para frangos de corte obterem o peso necessário para o abate vem reduzindo anualmente. Como consequência, todo o processo de criação passa a apresentar maior importância, visto a reduzida disponibilidade de tempo para recuperação de algum problema que venha a estar presente, seja esse de ordem sanitária, nutricional ou de manejo.

Concomitante à essa redução de idade ao abate, pressões e campanhas, inicialmente oriundas na Europa, passaram a pressionar produtores para a retirada de promotores de crescimento da alimentação das aves. Devido a possíveis aumentos da resistência de bactérias que estariam sendo encontradas não apenas em animais mas, também na população de um modo geral, esse banimento se expandiu da Europa para outras regiões, inclusive o Brasil. Estratégias de produtos que possam substituir a utilização de melhoradores de crescimento antibióticos tem sido desenvolvidos. Entretanto, o conceito de se ter a melhor estrutura de manejo, climatização, nutrição, etc. para que os animais possam expressar seu potencial tem sido um objetivo buscado por produtores e pesquisadores, mais importante que a utilização de um produto, específico.

Dentro, especificamente, da área de nutrição animal a utilização de produtos como enzimas, acidificantes, pré e próbióticos, entre outros, tem sido estudado para atender essa necessidade atual de substituição de promotores de crescimento. Além disso, estratégias nutricionais mais amplas e não especificamente ligadas à produtos específicos, como a utilização de ingredientes de maior digestibilidade, estímulo ao consumo alimentar e utilização de tipos específicos de fibras também tem demonstrado resultados positivos.

O período inicial de crescimento de frangos de corte é um momento crítico para o desempenho animal. Ao nascimento, frangos de corte apresentam um trato gastrointestinal ainda não plenamente desenvolvido. O intestino delgado apresenta vilos e criptas com formato sinoidal, com grande quantidade de enterócitos não adaptados para a produção de enzimas endógenas e transportadores para a absorção de nutrientes complexos. O processo de adaptação do sistema digestório levará de 7 a 14 dias, dependendo do parâmetro utilizado para definir esse processo. Tempo esse que pode representar até 50% do tempo de criação desses animais, dependendo do peso e idade programada para o abate.

Além de ser o sistema responsável pela digestão e absorção de nutrientes, o trato gastrointestinal também é uma das principais barreiras contra a entrada de organismos patogênicos no organismo animal. Um trato gastrointestinal íntegro é característica *si ne qua non* para o desenvolvimento animal dentro de padrões de ganho de peso e conversão alimentar esperados pelas linhas genéticas e pelas empresas produtoras devido ao bloqueio de entrada de bactérias patogênicas como também pelo menor gasto de energia e nutrientes ocasionados por respostas imunes como por exemplo respostas inflamatórias.

Considerando a importância do período inicial de desenvolvimento na produção de frangos de corte da disponibilidade de produtos e estratégias nutricionais disponíveis para esse objetivo, o presente estudo buscou avaliar o efeito da adição de betaína e fibra no desenvolvimento da mucosa intestinal. Tal avaliação foi desenvolvida em frangos de corte entre 0 e 14 dias de idade analisando características morfométricas como o peso relativo do intestino, pâncreas, fígado e saco vitelínico, altura e espessura de vilosidades intestinais, profundidade de cripta e cálculo da área de absorção. O número de células em replicação no vilos, secreção de ácido siálico e número de células caliciformes e a expressão gênica de proteínas da junção "Tight" (Claudina 1, Claudina 5 e Occludina) e de interleucina 2 foram avaliados para determinar a resposta local à presença de alimento no trato gastrointestinal enquanto a osmolalidade da digesta foi feita para avaliar a variação no conteúdo intestinal. Por último, a determinação da osmolalidade sanguínea e a proporção na população de leucócitos no sangue periférico foram avaliados para avaliar possíveis respostas sistêmicas e o desenvolvimento do sistema imune durante esse mesmo período inicial.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 DESENVOLVIMENTO INICIAL DO TRATO GASTROINTESTINAL DE FRANGOS DE CORTE

2.1.1 Caracterização do trato gastrointestinal da ave adulta

O trato gastrointestinal é formado por uma estrutura tubular modificada, dividido em órgãos de acordo com a estrutura e formação anatômica (BANKS, 1992). Esse trato é composto de quatro camadas concêntricas com características e funções distintas: mucosa, submucosa, muscular e serosa.

A camada mais externa é a camada serosa, formada por tecido conjuntivo envolvido pelo mesentério. Anterior à essa camada, esta a camada muscular que é formada por musculatura lisa circular e longitudinal: interna longitudinal, interna circular, externa circular e externa longitudinal (THOMASON et al., 2012). A contração dessas camadas musculares promovem os movimentos peristálticos e contrações segmentares, responsáveis pela mistura do conteúdo intestinal com as enzimas digestivas e para que os produtos da digestão entrem em contato com a superfície absorptiva e pela movimentação desse conteúdo presente no trato gastrointestinal (BANKS, 1992). A camada muscular apresenta em sua parede gânglios do sistema nervoso autônomo denominado de plexo mioentérico ou plexo de Auerbach. Essa inervação autonômica interfere na contração muscular, aumentando ou diminuindo sua intensidade, mesmo que o controle local desenvolvido pelo sistema nervoso digestório tenha a função primordial nesse desenvolvimento.

A terceira camada dentro da estrutura do trato gastrointestinal é a camada submucosa, constituída por um tecido conjuntivo denso e com a presença de glândulas que se abrem para o lúmen intestinal (MACARI et al., 2002). Além disso, a camada submucosa é rica em vasos sanguíneos e linfáticos responsáveis pela extração dos produtos da digestão para outras porções do organismo e nódulos linfóides como barreira de proteção à entrada de organismos patogênicos. A camada submucosa também apresenta em sua parede gânglios do sistema nervoso autônomo denominado de plexo submucoso, que controla as secreções. A camada interna do trato gastrointestinal é denominada de camada mucosa. Principalmente no intestino, a camada mucosa apresenta invaginações para o lúmen intestinal, denominadas vilos (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1995). Estes vilos são formados por enterócitos, células caliciformes e células enteroendócrinas. Enterócitos são as células de maior concentração nos vilos

intestinais, responsáveis pela digestão final do alimento e transporte de nutrientes (MACARI et al., 2002). Estas células apresentam em sua porção apical microvilos para aumentar a área de contato com o lúmen intestinal e assim aumentar a capacidade de digestão e absorção de nutrientes. Células caliciformes são responsáveis pela secreção de glicoproteínas responsáveis pela proteção do trato contra a ação de enzimas digestivas e células enteroendócrinas são produtoras de substâncias como hormônios e monoaminas que participam na regulação da digestão e absorção dos nutrientes (MACARI et al., 2002).

Na base da camada mucosa, células totipotentes em constante replicação servem de fonte para a formação dos vilos. A medida que as células migram da cripta para a região dos vilos, as células se diferenciam em enterócitos, células caliciformes e células enteroendócrinas exercendo sua função até atingirem o ápice do vilos e sofrerem extrusão conforme apresentado na Figura 2.1 (MACARI et al., 2002).

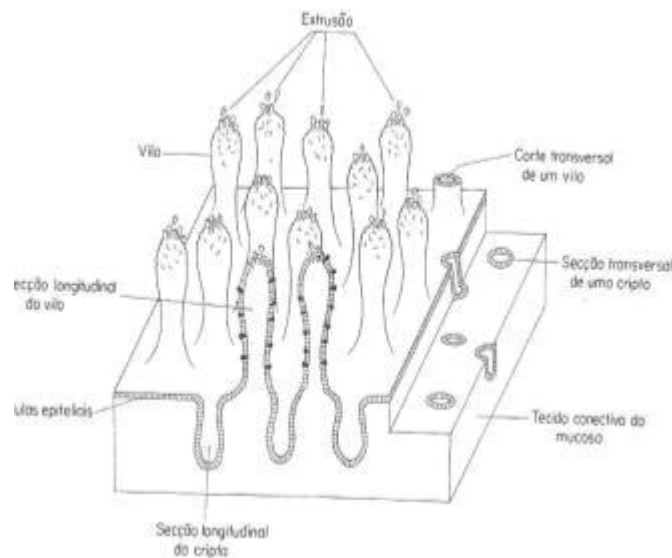


FIGURA 2.1 – ESQUEMA GERAL DA SUPERFÍCIE INTERNA DO INTESTINO, MOSTRANDO VILOS, CRIPTAS E PROCESSO DE EXTRUSÃO. ADAPTADO DE MACARI ET AL., 2002.

2.1.2 Desenvolvimento embrionário do trato gastrointestinal

O desenvolvimento de embriões pode ser classificado em três fases: crescimento, morfogênese e diferenciação. A fase de crescimento, caracteriza-se pela intensa divisão celular de células indiferenciadas que formarão os diversos órgãos e tecidos. Durante a morfogênese, passam a haver interações complexas entre esses grupos celulares, com a formação e desenvolvimento dos órgãos e tecidos. Já a diferenciação se caracterizaria pela terceira fase de desenvolvimento, em que esses órgãos passam por processos de

maturação fisiológica, com a formação de tecidos e órgãos com capacidade de desenvolver as funções específicas (MOORE & PERSAUD, 1994).

Apesar dessas fases não poderem ser isoladas de maneira definitiva, pode-se considerar que a fase de crescimento ocorreria nos dois primeiros dias de incubação, quando inicia-se a formação dos futuros órgãos do embrião. A fase de morfogênese finalizaria entre o décimo sétimo e décimo nono dia de incubação, quando o embrião internaliza o saco vitelínico para o interior da cavidade abdominal e passa a apresentar respiração pulmonar (PLANO & DI MATTEO, 2014; Figura 2.2).



FIGURA 2.2 – DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO DE FRANGOS DE CORTE AOS 2 (A) E 19 (B) DIAS DE INCUBAÇÃO DEMONSTRANDO A FORMAÇÃO DE VASOS INTRA (A-1) E EXTRA (A-2) EMBRIONÁRIOS E O PROCESSO DE INTERNALIZAÇÃO DO SACO DA GEMA (B). ADAPTADO DE PLANO E DI MATTEO, 2014.

A fase de adaptação pode ser caracterizada nesse mesmo período, entretanto a sua conclusão ocorrerá após a eclosão já que no momento da eclosão os órgãos podem não se apresentar plenamente desenvolvidos. No momento da eclosão, o tecido muscular esquelético apresenta alta concentração de células indiferenciadas (células satélites), a presença dessas células auxilia a hipertrofia muscular e consequentemente aumento do peso de peito (SKLAN et al., 2003). Essas células satélites atuam no processo de hiperplasia celular e aumento do diâmetro da fibra muscular pelo fornecimento de material genético para a produção de proteínas necessária para esse processo hiperplásico. O período pós eclosão é chave para esse desenvolvimento pois, por exemplo, um período de jejum longo acarretaria a redução da implantação e diferenciação dessas células

satélites nas fibras musculares, levando a menor hiperplasia e consequentemente redução de peso de peito (HALEVY et al., 2000).

Após a formação da gástrula, inicia-se o processo de diferenciação que levará à formação dos diversos órgãos e tecidos embrionários. O trato gastrointestinal é formado a partir da diferenciação celular de componentes presentes no endoderma da gástrula, diferenciando-se a partir de porções do saco vitelínico (MOORE & PERSAUD, 1994). O desenvolvimento intestinal inicia-se a partir do segundo dia de vida, com diferenciações entre a porção pré umbilical e pós umbilical e com a formação da alça duodenal visível a partir do terceiro dia de incubação, enquanto a porção pos umbilical apresenta-se de uma forma retilínea em direção à cloaca (SOUTHWELL, 2006). Entre o quinto e o nono dia de incubação já é possível observar respostas de contração muscular no trato gastrointestinal e o início de movimentos peristálticos mas novamente esse desenvolvimento ocorre em períodos distintos de acordo com o local do trato gastrointestinal (CHEVALIER et al., 2017). A presença de movimentos peristálticos foi verificada no sexto dia de incubação nas porções proximais do intestino enquanto somente estão presentes no nono dia de incubação na região cecal e esses movimentos peristálticos, apesar de dependentes de canais de cálcio, não dependem de inervações neurais (CHEVALIER et al., 2017).

O trato gastrointestinal aumenta linearmente de tamanho com a passagem do período de incubação, entretanto, observa-se a partir do décimo segundo dia de incubação um aumento exponencial da área de superfície do trato gastrointestinal. Esse aumento não está relacionado ao aumento do tamanho do trato gastrointestinal, mas sim devido à formação e aparecimento de vilos incipientes dentro das diversas porções do trato gastrointestinal, aumentando assim a área de superfície (THOMASON, et al., 2012). Nesse mesmo período observa-se ainda a organização das camadas musculares no intestino, conforme pode ser observado na Figura 2.3.

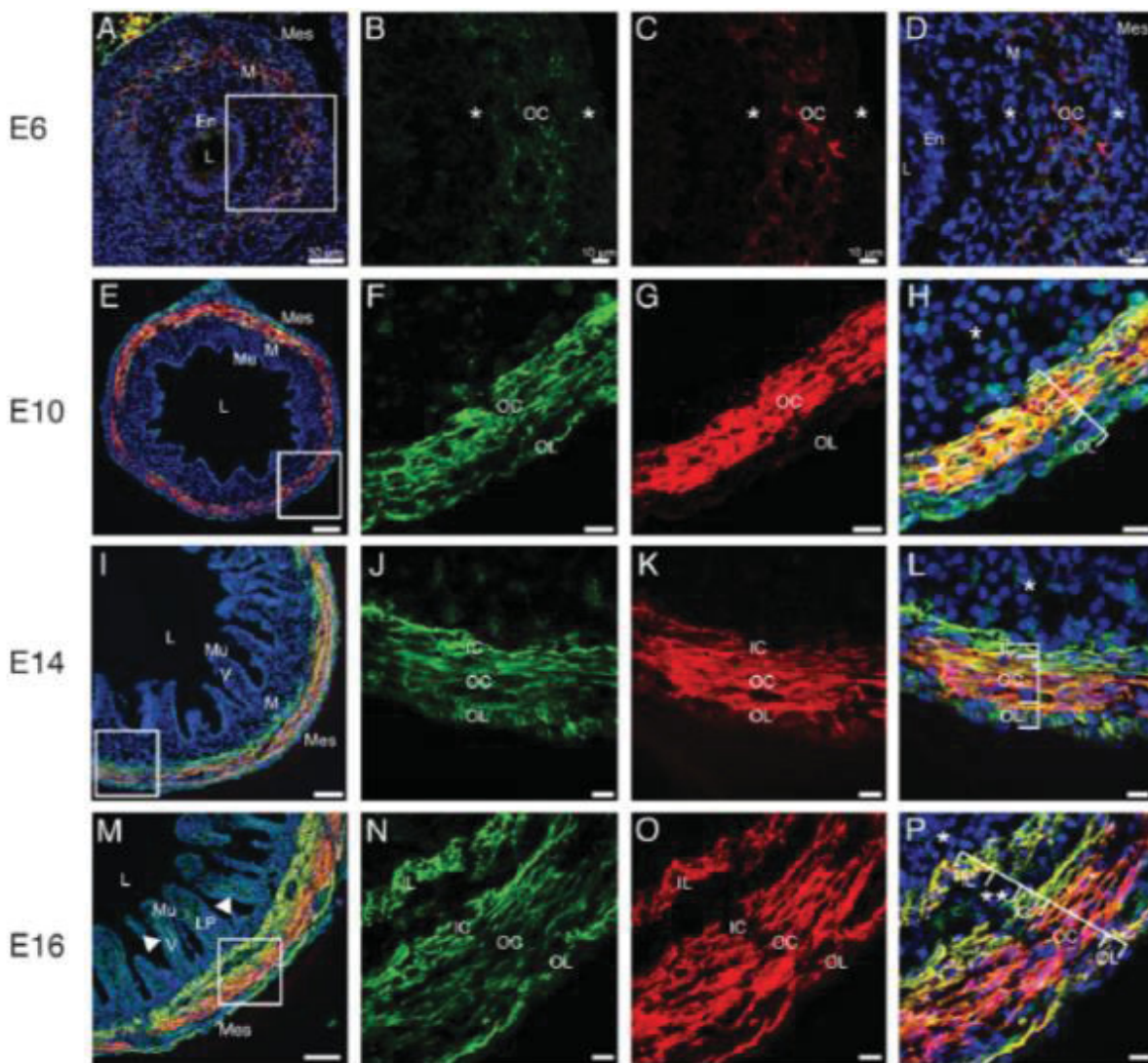


FIGURA 2.3 – DESENVOLVIMENTO INTESTINAL DE EMBRIÕES DE CODORNAS ENTRE 6 (E6) E 16 (E16) DIAS DE INCUBAÇÃO. É POSSÍVEL OBSERVAR A FORMAÇÃO DOS VILOS A PARTIR DO 14 DIA DE INCUBAÇÃO E FORMAÇÃO DAS CAMADAS MUSCULARES EXTERNAS (O) E INTERNAS (I) CIRCULARES (C) E LONGITUDINAIS (L) A PARTIR DO 16 DIA DE INCUBAÇÃO. ADAPTADO DE THOMASON ET AL., 2012.

No período final de incubação há grande desenvolvimento do trato gastrointestinal. Entre o décimo sétimo dia de incubação e à eclosão, o peso do intestino aumenta mais de 300%, passando de 0,46g para 1,54g, enquanto a representação no peso do embrião passa de 1,4% para 3,4% (UNI et al., 2003). A atividade transportadores de membrana (sucrase-isomaltase, Na/K ATPase, transportadores de glicose associado à sódio e aminopeptidase) também aumenta a partir de 19 dias de incubação (UNI et al., 2003). Segundo os autores, esse aumento representa a preparação do trato gastrointestinal para a função de absorção de nutrientes que o órgão passará à exercer a partir da eclosão e ao início do consumo de alimento. A expressão de RNAm para esses mesmos

transportadores apresenta padrão distinto, com ápice de expressão aos 19 dias de incubação, mas decrescendo no momento da eclosão. Segundo os autores, essa redução pode estar relacionada à alta concentração de transportadores já presentes na membrana dos enterócitos e associado à um período de alto desenvolvimento dos vilos.

2.1.3 Desenvolvimento e adaptação pós eclosão

O trato gastrointestinal das aves é responsável pela digestão e absorção de nutrientes consumidos. Em frangos de corte, na passagem de alimento pelo trato gastrointestinal, esse alimento sofre ações físicas (como a ação de maceração gerada principalmente pela ação da moela), químicas (como a mudança de pH ocasionada durante a passagem do alimentos pelos diversos órgãos presentes no trato gastrointestinal) e enzimáticas (devido à ação de enzimas endógenas produzidas pelos diversos órgãos do trato intestinal para acelerar o processo de hidrólise desse alimento). Além dessas ações, os microrganismos no trato gastrointestinal, principalmente no proventrículo e cecos (Figura 2.5), utilizam esse alimento presente como substrato para o seu crescimento, hidrolisando e modificando a composição do conteúdo presente no lúmen intestinal além de afetar a absorção de nutrientes (SIDDONS & COATES, 1972; VENEMA, 2010).

Após a digestão do alimento, componentes de menor peso molecular formados a partir da hidrólise do alimento são formados e absorvidos pela mucosa do trato gastrointestinal. Essa absorção pode ser feita de maneira ativa ou passiva, dependendo do tipo de nutriente e o local do trato gastrointestinal em que o mesmo está presente. Uma vez absorvidos dentro dos enterócitos, esses nutrientes são então transportados, novamente por transporte ativo ou passivo para a corrente sanguínea, sendo então distribuídos para todos outros órgãos e tecidos do animal. Esse processo de absorção, também depende de canais e transportadores presentes nas membranas que fazem tanto na membrana apical como na membrana baso-lateral o transporte dessas substâncias do lúmen intestinal para a corrente sanguínea (HOPFER et al, 1973; BROER, 2008; RODER et al., 2014). Aqueles compostos não absorvidos pelo trato gastrointestinal que formam as fezes são então excretados através da cloaca.

A eclosão representa para o neonato um período de transição. Durante o processo de incubação a absorção de nutrientes presentes no saco da gema, principal fonte de nutrientes para o desenvolvimento embrionário, é feito tanto pela passagem desse conteúdo pelo divertículo de Meckel para o íleo como diretamente através da irrigação sanguínea presente na membrana do saco vitelínico (NOY e SKLAN, 2001). O conteúdo

presente no saco vitelínico apresenta alta concentração de gordura e proteínas de baixo peso molecular e de fácil absorção (DING e LILBURN, 1996). Após a eclosão, entretanto, a alimentação desses animais passa a ser composta por fontes energéticas e proteicas mais complexas, principalmente carboidratos oriundos de cereais como milho e trigo e proteínas oriundas de soja e fontes de produtos de origem animal como farinhas de carne e de vísceras.

O conteúdo presente no saco vitelínico no momento da eclosão muitas vezes é visto como uma reserva nutricional para o desenvolvimento animal. Esse conteúdo, entretanto, não apresenta valor nutricional e energético que consiga sustentar a necessidade nutricional e gasto energético durante um dia de vida e são, na realidade, fontes nutricionais utilizadas para o desenvolvimento do sistema imune (DIBNER et al., 1998). Mesmo no primeiro dia de vida, a principal fonte de energia e nutrientes dos frangos de corte advém da alimentação e é importante que o trato gastrointestinal se desenvolva da maneira mais rápida possível para assegurar que os alimentos consumidos sejam digeridos e os nutrientes absorvidos na maior quantidade possível.

No momento da eclosão, pintos de corte não apresentam o trato gastrointestinal plenamente desenvolvido. Em análises microscópicas, é possível observar que esses animais apresentam vilos intestinais pouco desenvolvidos, em formato de sino ou pera (UNI et al., 2003). Além disso, as células que compõem esses vilos apresentam formato cubico, com núcleo centralizado e microvilos praticamente inexistentes (GEYRA et al., 2001). As criptas também se apresentam de maneira rudimentar, pequenas e mal estruturadas.

Utilizando antígeno nuclear para células em replicação (PCNA), APPLEGATE et al. (1999) observaram alta concentração de células com caráter proliferativo na cripta e na porção intermediária dos vilos em perus no momento da eclosão. A quantidade de células positivas para coloração com antígeno PCNA se mantém constante na cripta a partir do momento que inicia-se a alimentação dos animais enquanto nos vilos há uma redução gradativa até o quinto dia pós eclosão. Ainda segundo os mesmos autores, a concentração de células com caráter proliferativo é superior na região da cripta, apesar de estar também presente na região dos vilos. Já em frangos de corte, no momento da eclosão, praticamente todas as células presentes nos vilos e cripta intestinais apresentam características de células em proliferação, sendo que essa proporção reduz rapidamente para 50% nas criptas e 10 a 20% nos vilos após aproximadamente 150 horas (GEYRA et al., 2001). Segundo UNI et al. (1998), diferente de mamíferos, aves apresentam células em proliferação não restritas somente à área da cripta mas também na extensão dos vilos

intestinal. A alta concentração de células em proliferação nos vilos, entretanto, pode significar comprometimento do processo de digestão e absorção de alimentos.

Além da estrutura dos vilos, também os processos de digestão e absorção de alimentos é pouco desenvolvida nos primeiros dias após eclosão (MORAN JR, 2007). Frangos de corte nos primeiros dias após a eclosão apresentam baixa capacidade de produção de enzimas endógenas, responsáveis pela hidrólise dos nutrientes em porções menores que possam ser absorvidas. Além disso, a concentração e atividade de transportadores de membrana presentes nos enterócitos também é baixa logo após a eclosão, fazendo com que grande quantidade de conteúdo fique presente no lúmen intestinal, servindo de substrato para o crescimento bacteriano que passa a formar a microbiota do animal.

No momento da eclosão, frangos de corte apresentam criptas pequenas, após a eclosão, entretanto, tanto as criptas como a estrutura dos vilos se desenvolvem rapidamente (UNI et al., 2000). Já nos primeiros dias após a eclosão, o trato gastrointestinal passa por intenso período de transformação, desenvolvimento e adaptação, o que pode ser caracterizado pelo intenso crescimento desse órgão em comparação com os demais órgãos e tecidos animais. Durante os primeiros dias pós eclosão o peso relativo do trato gastrointestinal aumenta drasticamente, caracterizando um crescimento superior a qualquer outro órgão e tecido animal. DOS SANTOS et al. (2010) observaram que o peso relativo do trato gastrointestinal aumenta de aproximadamente 6% do peso vivo do embrião aos 18 dias de incubação para 13% ao nascimento, 18% aos 7 dias de vida e retornando à 12% aos 21 dias de vida.

Microscopicamente também se observa que as criptas passam a ser menos difusas e apresentar a ter uma estrutura acinar. Os vilos deixam de apresentar a formação em pera, aumentam de tamanho e percebe-se a formação das microvilosidades (GEYRA et al., 2001; UNI et al., 2003), caracterizando grande aumento da área disponível para a absorção dos nutrientes (GEYRA et al., 2001). Os enterócitos crescem em tamanho, com núcleo mais próximo da região basal e o número de células com características de células em replicação diminuem, caracterizando células maduras (GEYRA et al., 2001).

Fisiologicamente, as mudanças também são observadas com maior capacidade de produção de enzimas endógenas e aumento da concentração e atividade de transportadores de membrana para a absorção desses nutrientes (UNI et al., 1998). A atividade desses transportadores também aumenta (UNI et al., 1999).

Como consequência dessa falta de adaptação do trato gastrointestinal para essa nova realidade, a digestibilidade nos primeiros dias de vida se encontra restrita, abaixo de

valores que serão comumente encontrados em aves mais velhas. Como consequência, a prática comum para essas aves em fase inicial é a busca por ingredientes que sejam naturalmente mais digestíveis, reduzindo assim a perda gerada por essa baixa capacidade de digestão, com isso, asseguram o correto desenvolvimento do trato gastrointestinal nesses primeiros dias de vida e consequentemente resulta no melhor ganho de peso e conversão alimentar no decorrer da vida do animal. LEITE et al (2011) observaram que o coeficiente de digestibilidade de matéria seca de frangos de corte alimentados com uma dieta milho/farelo de soja aumentou de 44,5% quando a análise de digestibilidade é feita entre 10 e 14 dias de vida para 66,2% quando a mesma metodologia é repetida entre 24 e 28 dias de vida.

O tempo estimado para adaptação do trato gastrointestinal dependerá muito do parâmetro utilizado para determinar esse processo. Normalmente, acredita-se que essa adaptação esteja finalizada entre os 7 e 14 dias de idade, quando as aves apresentariam capacidade de digestão e absorção de nutrientes equivalentes à aves até o fim do ciclo de vida desses animais (MORAN JR, 2007; GEYRA et al., 2001).

2.1.4 Desenvolvimento inicial e desempenho de frangos de corte

O intenso desenvolvimento do trato gastrointestinal nos primeiros dias após a eclosão poderá afetar o desenvolvimento animal em todo o período de criação, uma vez que possibilitaria maior capacidade de digestão e absorção de nutrientes. Como essa absorção é feita através dos enterócitos, o aumento do tamanho do trato gastrointestinal, principalmente do jejuno e íleo, possibilita aumentar a capacidade de absorção de nutrientes. Além disso, a mucosa do intestino das aves apresenta vilosidades e microvilosidades, presentes com o intuito de aumentar a área de superfície de contato desta mucosa com o conteúdo intestinal e assim consequentemente a taxa de absorção de nutrientes. UNI et al. (1999) observaram correlações positivas entre a atividade enzimática, o número de enterócitos presentes em vilosidade e o peso vivo em perus. A maior atividade de amilase no conteúdo intestinal está presente em frangos de corte que apresentam vilos mais longos (MANEERWAN e YAMAUCHI, 2005), levando a correlação negativa entre profundidade da cripta e a absorção de glicose no trato gastro-intestinal de leitões (PLUSKE et al., 1996) o que estaria relacionado à maior concentração de enterócitos não adaptados para a absorção de nutrientes complexos no vilos. MAIORKA et al. (2003) observaram redução de peso e extensão do intestino de frangos em jejum alimentar e/ou hídrico nos primeiros dias de vida, afetando assim sua capacidade de absorção de nutrientes.

Outros sistemas que apresentam desenvolvimento crítico durante essa fase inicial, como sistema imune e tecido muscular esquelético. DIBNER et al. (1998) observaram que o fornecimento de alimento nos primeiros dias de vida aumenta o peso da Bursa de Fabricius, acelera o aparecimento de IgA na bile e centros germinativos nas tonsilas cecais e conseqüentemente melhora a resistência à desafios patogênicos e o ganho de peso das aves. Segundo DIBNER et al. (1998), esse efeito seria consequência da utilização dos componentes presentes no saco vitelínico para a função às quais estão presentes como passagem de imunidade passiva, síntese de imunomoduladores, membrana celular, desenvolvimento do sistema nervoso e transporte de lipídeos e não meramente como fonte de energia como pode ocorrer caso o fornecimento de alimento não seja feita de maneira adequada para esses animais. O processo de desenvolvimento e maturação das fibras musculares é extremamente precoce e limitado aos dois primeiros dias de vida, caracterizando esse período como crucial para o crescimento muscular esquelético da ave e influenciando o desenvolvimento animal a longo prazo (GOMES, 2007). A musculatura esquelética representa aproximadamente 31% do peso vivo de frangos de corte ao final da primeira semana de vida, essa proporção aumenta gradualmente a medida que o animal cresce, chegando à 52,4% após 10 semanas de vida (MURAWSKA et al., 2011; Figura 2.4). Esse crescimento muscular dá-se através da hipertrofia das fibras musculares, uma vez que não há mitose das miofibrilas após o nascimento (GOMES, 2007). Esse processo de hipertrofia ocorre mediante a ação de células precursoras miogênicas presentes na musculatura esquelética, denominadas células satélites que se juntam às fibras pré-existentes, aumentando o conteúdo de DNA muscular e assim promovendo a hipertrofia. HALEVY et al. (2000) observaram retardo no crescimento muscular e redução na concentração de células satélite no peito de frangos mantidos em jejum durante as primeiras horas pós eclosão, sendo que essa diferença se manteve o decorrer do desenvolvimento animal.

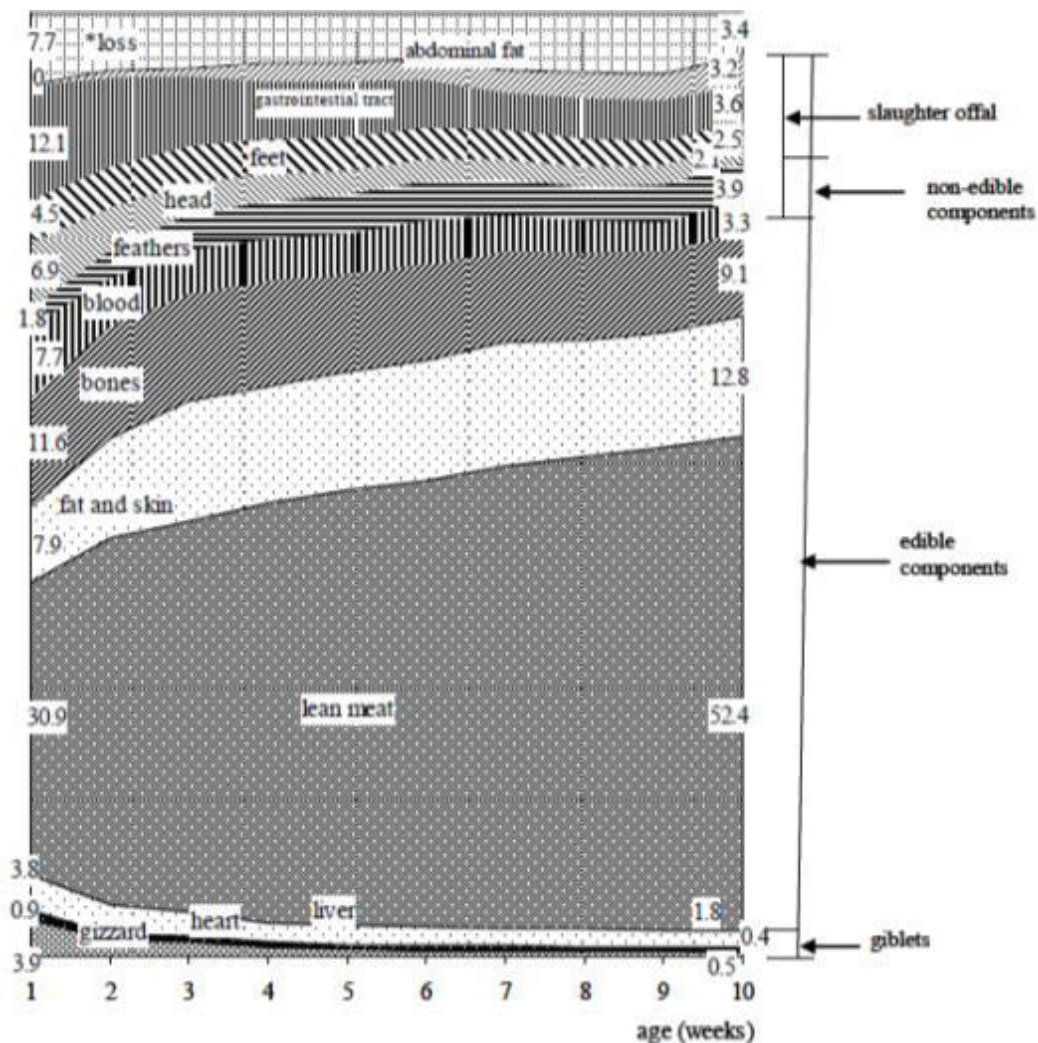


FIGURA 2.4 – CONTEÚDO DE COMPONENTES E TECIDOS (EM % DO PESO VIVO) DE FRANGOS DE CORTE ENTRE 1 E 10 SEMANAS DE VIDA. ADAPTADO DE MURAWSKA ET AL., 2011.

2.2 O SISTEMA IMUNE DAS AVES COM FOCO NO TRATO GASTROINTESTINAL

2.2.1 Sistema imune

Animais são constantemente expostos a agentes patógenos como vírus, bactérias, fungos e parasitas em diferentes partes do organismo como o trato gastrointestinal, pele, vias respiratórias, entre outros. Organismos animais possuem no sistema imune um sistema de defesa desenhado para evitar que esses agentes possam colonizar órgãos e tecidos, sendo função desse sistema identificar células e estruturas próprias e estranhas ao organismo. Além dessa função de defesa, o sistema imune atua de maneira associada ao sistema nervoso, controlando eventos que possam afetar a homeostasia do organismo

(TADA et al, 1997), captando alterações no meio externo e traduzindo em respostas sistêmicas de maneira associada aos sistemas endócrino e nervoso (BLALOCK et al, 1984). Como exemplo de respostas imunes não associadas diretamente à agentes patogênicos, SCHWARTZ et al. (2009) observaram que quadros de mudanças de osmolaridade no meio extracelular, tanto com aumento como redução da osmolaridade, são gatilhos para a geração de respostas inflamatórias, atuando de maneira associada ou mesmo fazendo parte do mesmo fenômeno.

O sistema imune das aves é formado por órgãos linfóides primários e secundários e também de leucócitos, que são distribuídos através da corrente sanguínea para distintos órgãos e tecidos. Além disso, para a defesa do organismo, outras características naturais como a presença de microbiota comensal, junção paracelular, variação de pH e presença de muco em vias respiratórias e digestória também servem de barreira contra organismos patogênicos e outros desafios presentes no meio ambiente.

2.2.2 Órgãos linfóides primários

Órgãos linfóides primários são caracterizados pela produção e diferenciação dos linfócitos. Em aves, são considerados órgãos linfóides primários a medula óssea (local inicial de desenvolvimento das células do sistema imune), o timo (onde ocorre a produção e diferenciação dos linfócitos T) e a Bursa de Fabricius (onde ocorre a produção e diferenciação dos linfócitos B). O timo se localiza na região do pescoço das aves, próximo à tireóide. Seu peso varia de acordo com a fase de vida animal, tendo maior peso relativo em animais jovens, alcançando maior peso total próxima à idade reprodutiva e regredindo a partir da idade adulta (TIZARD, 1998). A maior função do timo é a produção e diferenciação de linfócitos T, que, quando liberados na circulação, são responsáveis pela imunidade celular do animal.

A Bursa de Fabricius é um órgão encontrado nas aves, se caracteriza como um saco redondo localizado acima da cloaca (TIZARD, 1998). Assim como o timo, a Bursa de Fabricius apresenta rápido crescimento no período inicial de vida das aves, sofrendo involução posteriormente. A Bursa de Fabricius é o local de diferenciação dos linfócitos B, responsáveis pela produção de anticorpos (imunidade humoral) do animal. Como órgãos linfóides primários se desenvolvem rapidamente nos animais jovens e posteriormente involuem, isso caracteriza a importância desta fase pós eclosão. Quaisquer problemas ou interferências nesta fase inicial, poderão afetar o desenvolvimento e adaptação desses órgãos e, conseqüentemente, diminuir a capacidade desses animais a se defenderem contra organismos patogênicos ou outros desafios que venham a sofrer.

2.2.3 Órgãos linfoides secundários

Nos órgãos linfoides secundários, ao contrário do que ocorre nos órgãos linfoides primários, não há o desenvolvimento e diferenciação de linfócitos. Nesses órgãos, há a presença de grande concentração de macrófagos que capturam e processam antígenos e linfócitos T e B que, uma vez apresentados para esses antígenos, promoverão as respostas imunes celular e humoral (TIZARD, 1998). Os principais órgãos linfóides secundários são a medula óssea e o baço.

Além desses, as aves, ao contrário de mamíferos, não apresentam circulação linfática e linfonodos distribuídos no organismo, apresentam grande concentração de estruturas linfóides no trato respiratório, urogenital e gastrointestinal. Essas estruturas encontradas no trato gastrointestinal representam parte importante do sistema imune, principalmente por existirem inúmeros patógenos que podem estar presentes na luz do trato digestivo (MACARI et al., 2002). Esses órgãos linfóides não são distribuídos de maneira uniforme dentro do trato intestinal, mas são mais concentrados em sua parte posterior e especialmente abundantes no ceco (YEGANI & KORVER, 2008) onde também encontra-se a maior concentração de população bacteriana.

2.2.4 Leucócitos

Os leucócitos são as unidades moveis do sistema de proteção do organismo (GUYTON e HALL, 1997). Após serem produzidos e diferenciados nos órgãos linfoides primários, os leucócitos são transportados pelo sangue para os diversos órgãos e tecidos. Nestes, e no próprio sangue, os leucócitos exercem sua função de defesa do organismo.

Os leucócitos são classificados em granulócitos ou agranulócitos, de acordo com sua morfometria nuclear. Granulócitos são compostos por heterófilos, eosinófilos e basófilos já agranulócitos são compostos por trombócitos, monócitos, e linfócitos. Cada um desses grupos celulares apresenta funções e características específicas.

Heterófilos são classificados devido à presença de heterocromatina formando massas densas (MACARI et al., 2002). Apresentam função semelhante aos neutrófilos em mamíferos e apresentam uma função de mediação da imunidade inata, especialmente em aves jovens que ainda não desenvolveram imunidade adquirida (Kogut et al., 1998). Eosinófilos em aves são classificados como grânulos citoplasmáticos que se tingem de azul quando corados com hematoxilina e eusina (MACARI et al., 2002). Em mamíferos, células com mesmas características estão associadas à defesa contra infecções parasitárias (TIZARD, 1998) mas sua função em aves não está bem determinada uma vez

que não são frequentemente encontrados nesse tipo de inflamação. Por último, basófilos são o tipo celular menos numeroso dos granulócitos, apresentam grânulos citoplasmáticos escuros e com função semelhante à dos mastócitos em mamíferos (MACARI et al., 2002). Seus grânulos apresentam aminas vasoativas como a histamina (TIZARD, 1998), atuando em respostas alergênicas e em estágios iniciais do processo inflamatório.

Ao contrário de mamíferos, aves não apresentam plaquetas circulantes, sendo o processo de coagulação dependente da presença de trombócitos (KUNICKI e NEWMAN, 1985). Além disso, essas células apresentam grande capacidade fagocítica, compondo um papel importante do processo de resistência à infecção em aves (MACARI et al., 2002). Os monócitos representam cerca de 5% da população leucocítica sanguínea (TIZARD, 1998), e apresentam baixa capacidade fagocítica, sendo considerada uma célula imatura (GUYTON e HALL, 1997). A passagem dos monócitos da corrente sanguínea para os tecidos ocorre por diapedese, quando esse grupo celular se diferencia em macrófagos, que passam a receber nomenclaturas diferentes dependendo do tecido onde estão presentes (Osteoclasto, macrófago alveolar, histiócito, micróglia entre outros).

Os macrófagos são a primeira linha de defesa contra agentes infecciosos, tendo função regulatória sobre o tipo de resposta imune a ser desenvolvida. Sua origem pode se dar tanto a partir de monócitos presentes na corrente sanguínea como por reprodução diretamente nos tecidos onde os macrófagos estão presentes. O processo de ativação de macrófagos como a comunicação para regulação do tipo de resposta imune se dá pela liberação de citocinas que podem ter ação autócrina, parácrina ou sistêmica (TIZARD, 1998). A ação dos macrófagos se dá pela fagocitose de corpos estranhos ao organismo; após a fagocitose. O corpo estranho é processado e, dependendo de sua origem e natureza, pode levar à ativação de resposta adquirida. Essa resposta pode ser tanto através da resposta imune humoral, levando à produção de anticorpos, como através da resposta imune mediada por células (GUYTON e HALL, 1997). Tanto a resposta imune humoral como a resposta imune celular são coordenadas pela ativação de grupos de linfócitos específicos.

Os linfócitos podem ser divididos em linfócitos B e linfócitos T. Linfócitos B são produzidos na Bursa de Fabricius e são responsáveis pela imunidade humoral, mediante a produção de anticorpos. O reconhecimento desses antígenos se dá pela presença de imunoglobulinas na superfície dessas células, possibilitando o reconhecimento de antígenos intactos. Os anticorpos são específicos para o antígeno apresentados ao linfócito e atuam pela ligação direta ao antígeno como pela ativação do sistema

complemento (MACARI et al., 2002). A ligação do anticorpo ao antígeno promove a formação de grânulos, facilitando a fagocitose, promovendo a insolubilização desse complexo ou reduzindo sua patogenicidade (GUYTON e HALL, 1997).

Linfócitos T são ativados pelas células apresentadoras de antígenos. Essas células agem sobre células e compostos que não são reconhecidas pelo organismo como próprios, promovem sua fagocitose e apresentam esses antígenos para os linfócitos T. Esses linfócitos, produzidos no Timo, podem estimular o crescimento e diferenciação de linfócitos B, ativar macrófagos mediante a liberação de citocinas e promover a lise de células infectadas por vírus. No caso de células tumorais, o processo de lise é ativado normalmente por linfócitos grandes chamados de células *Natural Killers*.

Após uma primeira infecção, ocorre a formação de uma memória tanto para a imunidade humoral como a imunidade mediada por células. A presença dessa memória faz com que no caso de um segundo contato com o mesmo antígeno apresente resposta à esse desafio de maneira muito mais rápida (TIZARD, 1998), possibilitando a redução da patogenicidade quando de uma segunda infecção como em casos de vacinações. Essa resposta imune adquirida é mediada pelos linfócitos, sendo que estes apresentam populações específicas de acordo com o tipo do antígeno e a resposta gerada.

2.2.5 Imunidade natural ou inespecífica

Além de mecanismos de defesa humorais e mediados por células, os organismos também apresentam mecanismos inespecíficos, responsáveis principalmente por evitar principalmente a invasão inicial desses organismos patogênicos. Essa imunidade natural depende de processos gerais e não direcionados para organismos específicos como fagocitose de corpos estranhos, secreções gástricas e enzimas digestivas, resistência da pele e mucosas e compostos químicos como lisozima e complexo complemento (GUYTON e HALL, 1997). Esses mecanismos inespecíficos são principalmente importantes nas superfícies corporais, visto o grande contato com esses microrganismos e serem através dessas superfícies que normalmente ocorre a invasão (TIZARD, 1998).

Por ser um mecanismo de defesa inespecífico, diferente da imunidade humoral e mediada por células, a imunidade natural age de forma mais abrangente, não sendo específica para um antígeno ou patogenia específica e tendo menor custo energético (MACARI et al., 2002). Sua ação é baseada em efeitos gerais que podem ter diferentes mecanismos tais como: mecânicos, químicos, físicos, biológicos entre outros. Dependendo do tipo de exemplo, mais de uma forma de defesa pode estar presente como no caso da produção de muco, podendo trazer tanto uma resposta mecânica,

retirando o componente agressor, como também uma resposta física por servir de barreira contra uma possível colonização da mucosa por organismos patogênicos. Devido à grande concentração de microrganismos, o trato gastrointestinal é um dos principais pontos em que a imunidade natural ou inespecífica está presente.

Respostas antiperistálticas e diarreia, o fluxo do transito gastrointestinal e a produção e movimentação do muco são exemplos de imunidade natural de natureza mecânica. Em todos esses casos, objetiva-se a retirada mecânica do possível componente agressor presente na mucosa, reduzindo assim sua concentração e facilitando a recuperação da homeostasia. ONYANGO et al. (2009) observaram que a presença de ácido fítico no trato gastrointestinal de frangos de corte faz com que esses animais aumentem a produção de muco e secreção de ácido siálico (um marcador da produção de muco), aumentando assim as perdas endógenas associadas à essa produção. Um exemplo desse efeito foi a redução na digestibilidade de aminoácidos como treonina, prolina e serina, aminoácidos esses presentes em alta proporção na formação das glicoproteínas que compõe o muco.

Mecanismos de defesa químicos podem ser descritos como aqueles em que fatores químicos servem como mecanismo de defesa contra processos de invasão. A variação do pH no trato gastrointestinal, principalmente a redução do pH no proventrículo e na moela dos frangos, são exemplo de barreira química contra a invasão de microrganismos patogênicos. Além de ter a função de ativação de proteases gástricas, promovendo assim a digestão das proteínas oriundas da alimentação, a redução do pH no proventrículo e na moela servem de barreira para microrganismos que não resistem a esse ambiente de pH baixo, servindo assim como barreira para os mesmos. YEOMAN et al. (2012) observaram que a concentração de bactérias na moela de frangos de corte é aproximadamente 90% inferior à quantidade de bactérias presentes no papo e intestino delgado e apenas 0,01% da quantidade de bactérias presentes no intestino grosso, principal ponto de fermentação presente no trato gastrointestinal das aves (Figura 2.5). Além disso, a diferença entre as espécies de bactérias presentes em cada ponto do trato gastrointestinal demonstram a ação sanitizante do baixo pH do proventrículo e moela na colonização do trato gastrointestinal.

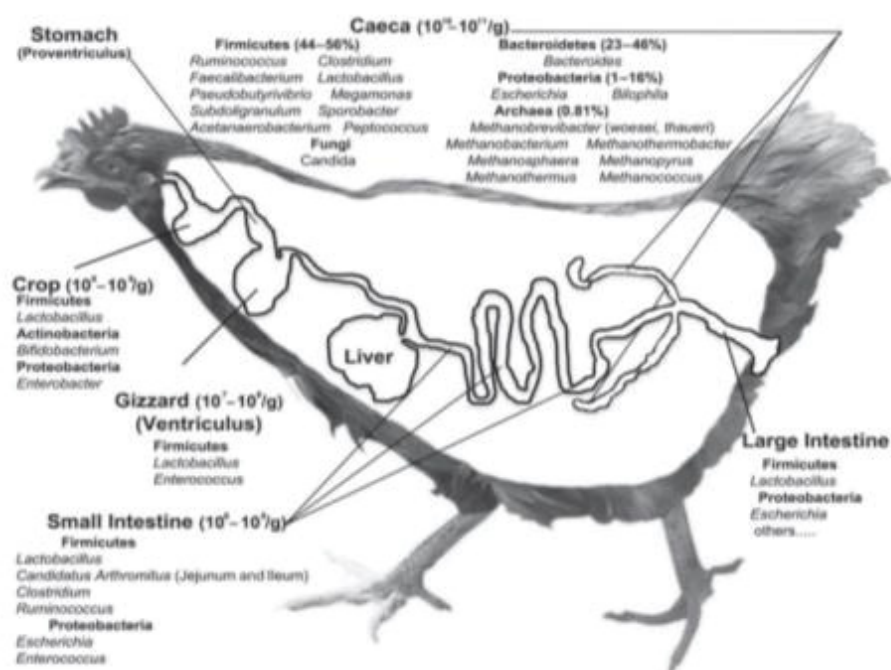


FIGURA 2.5 – ABUNDANCIA E PRINCIPAIS ESPÉCIES DE BACTÉRIAS ENCONTRADAS NO TRATO GASTROINTESTINAL DE FRANGOS DE CORTE. ADAPTADO DE YEOMAN ET AL., 2012.

Mecanismos físicos de defesa são aqueles em que uma barreira fisicamente protege o organismo contra lesão e ou a entrada de patógenos. Além da produção de muco, servindo como barreira física contra a colonização por vírus e bactérias, outras barreiras físicas presentes no trato gastrointestinal são, por exemplo, as junções paracelular “Gap” e “Tight”. Junções “Gap” e “Tight” estão presentes no espaço intracelular entre enterócitos no trato gastrointestinal servindo de maneira a selar o espaço intracelular entre células epiteliais e assim prevenindo a difusão de microrganismos e outros antígenos através do epitélio (ULLUWISHEWA et al., 2011). A expressão de proteínas associadas às junções “Tight” e “Gap” como ocludina e claudina pode depender de acordo com fatores nutricionais. NEYRINCK et al., (2012) observaram por exemplo que a presença de produtos de fermentação de fibras (oligossacarídeos de arabinosilanos) aumentou a expressão dessas proteínas, sugerindo um menor tônus inflamatório associado à maior função dessa barreira à entrada de patógenos. Outro mecanismo de imunidade natural são as barreiras biológicas. Nesse caso, a própria população bacteriana presente, por exemplo no trato gastrointestinal, forma um ambiente e gera competição por substrato que acaba dificultando a implantação e crescimento, por exemplo, de bactérias patogênicas. O estudo do impacto da microbiota do trato gastrointestinal e seu efeito no sistema imune e desempenho de frangos já vem sendo estudado de maneira intensa (VANDEPLAS et al., 2009; ASHRAF et al., 2013; MULDER

et al., 2014; SWIATKIEWICZ et al., 2014). A implantação de uma microbiota nos animais jovens, afeta a composição da microbiota de adultos, mantendo a homeostase da imunidade inata de mucosa e assim limitando respostas inflamatórias excessivas no trato gastrointestinal (MULDER et al., 2014).

2.2.6 Resposta inflamatória

A partir da ocorrência de uma lesão tecidual, seja pela presença de bactérias, descontinuidade tecidual, substâncias químicas, calor, características extracelulares entre outros, gera-se mudanças teciduais. O conjunto dessas mudanças teciduais é chamado de inflamação (GUYTON e HALL, 1997).

O processo de inflamação aguda ocorre em menos de uma hora após o dano tecidual. Esse estágio se caracteriza pela presença de calor, vermelhidão, inchaço, dor e perda de função da região afetada (TIZARD et al., 1998). Além dessa resposta local, uma resposta sistêmica pode estar presente, com o estímulo do centro termorregulador no sistema nervoso central aumentando a temperatura corporal e reduzindo o apetite animal.

O aumento de permeabilidade vascular, permitindo o extravasamento de líquido para a porção extracelular permite reduzir a velocidade de filtração dessa área, evitando que qualquer fator agressivo se espalhe pelo organismo, além de possibilitar o aumento de permeabilidade e a migração de leucócitos para a zona afetada (MACARI et al., 2002). Essa migração de leucócitos segue um padrão, iniciando com a presença de heterófilos e monócitos seguidos por uma migração de basófilos e por último a presença de linfócitos (MACARI et al., 2002). Essa migração deve-se à liberação de fatores quimiotáticos liberados por células dos tecidos, macrófagos presentes nos tecidos ou outros leucócitos, promovendo a estimulação desses leucócitos, formação de macrófagos a partir de monócitos e fagocitose de tecido morto, bactérias e outros corpos estranhos (TIZARD et al., 2002).

O processo de inflamação pode causar danos ao tecido em que está presente e deve ser controlado a medida que o dano ou antígeno presente é reduzido. Caso esse processo não ocorra, o processo inflamatório gera uma resposta crônica pela formação de tecido conjuntivo e processo de cicatrização que compromete a função do tecido original. Em casos extremos, onde a presença do antígeno se mantém constante, o estímulo à um aporte contínuo de macrófagos também se mantém, gerando uma lesão local e formação de granulomas por um acúmulo de macrófagos, fibroblastos, tecido conjuntivo frouxo e vasos sanguíneos recém-formados (TIZARD, 2002).

2.3 UTILIZAÇÃO DE FIBRA NA NUTRIÇÃO DE FRANGOS DE CORTE

2.3.1 Determinação do conteúdo de fibra

Fibra é um dos componentes bromatológicos utilizados para a determinação da qualidade de ingredientes e alimentos utilizados em nutrição tanto humana como animal. O termo “fibra” tem sido utilizado desde a metade do século 19, quando a Estação Experimental de Weende, na Alemanha, publicou seus métodos para análise bromatológica (CHOCT, 2015). A metodologia proposta determinava a concentração de fibra mediante a porção de conteúdo restante após uma sequência de extrações ácidas e alcalinas.

A mesma metodologia é utilizada até hoje em nutrição animal, sendo descrita como a concentração de fibra bruta do ingrediente ou alimentos. O material resultante da extração de utilizado por essa metodologia é composto basicamente por compostos fenólicos e celulose. Altas concentrações de fibra bruta são associados normalmente a ingredientes e alimentos de baixo valor nutricional e baixa digestibilidade para aves e suínos (ANDRIGUETTO et al., 1981).

A concentração de fibra bruta, entretanto, não representa a concentração total de fibra presente na amostra analisada e, desde então, diversos métodos para determinação da concentração de fibra em ingredientes tem sido buscado, utilizando para tanto classificações distintas. Outras metodologias normalmente utilizadas em nutrição animal são a determinação em fibra detergente neutro (FDN) e em fibra detergente ácido (FDA). Essas metodologias, entretanto, não apresentam grande precisão quanto às estruturas químicas e funções biológicas dos compostos extraídos (CHOCT, 1997).

O desenvolvimento de pesquisas demonstrando o efeito positivo do consumo de fibra na saúde intestinal apresentou a necessidade de definição clara do que seria considerado fibra dietética, inicialmente para humanos. Já em 2003, uma conferência de pesquisadores na Holanda reafirmou a definição adotada pela AACC (American Association for Clinical Chemistry) em 2001 de que fibra dietética é a parte comestível das plantas ou carboidratos análogos que são resistentes à digestão e absorção pelo intestino delgado e podem ser parcialmente ou totalmente fermentados no intestino grosso (VAN DER KAMP et al., 2004). Já em 2008, a comunidade europeia definiu fibra dietética como sendo “polímeros de hidratos de carbono com três ou mais unidades monoméricas que não são digeridas nem absorvidas pelo intestino delgado humano” (EU 2008/100/EG).

Na nutrição de monogástricos, fibra dietética pode ser considerada como sendo a soma da composição de polissacarídeos não amídicos e lignina presentes nos alimentos

(CHOCT, 2015). Polissacarídeos não amiláceos, por sua vez, seriam compostos diversos tipos de açúcares ou carboidratos que não apresentam ligação glicosídica α 1-4, característica de ligações amídicas (ENGLYST et al., 2007).

A caracterização da fibra como indigerível não determina, por si só, que seja um composto benéfico para a saúde intestinal (ENGLYST et al., 2007) ou mesmo que apresente características antinutricionais. A determinação da composição de monômeros presentes nesses polisacarídeos, e seu fracionamento baseado na solubilidade em água apresentam vantagens por poder melhor entender a característica e a composição da fibra presente nos ingredientes (CHOCT, 2015) e assim melhor caracterizar os possíveis efeitos, positivos e negativos, de sua utilização na nutrição de monogástricos. Essa informação é gerada a partir da análise da fibra pelo método conhecido como Método de Uppsala, cuja quantificação dos resíduos de monômeros de carboidratos é convertida em alditol acetato e mensurada por cromatografia gasosa (THEANDER et al., 1995).

A classificação de fibra de acordo com sua solubilidade é importante já que fibra solúvel é associada com efeitos negativos na utilização de nutrientes pelos frangos de corte (KNUDSEN, 2014). Por outro lado, essa fibra solúvel é também a mesma mais predisposta à fermentação na porção posterior do trato gastrointestinal gerando oligosacarídeos que respondem, em parte, dos efeitos benéficos da utilização de fibra na saúde intestinal e desempenho dos frangos.

Na Tabela 2.1 segue descrita a composição fibrosa por diferentes metodologias de alguns ingredientes vegetais utilizados na nutrição de frangos de corte (ROSTAGNO et al., 2017). Apesar de não serem as mesmas amostras que, necessariamente sejam analisadas pelas distintas metodologias, fica claro que a referência utilizada para determinação da composição e da qualidade da fibra é importante na sua quantificação e caracterização. A determinação de fibra através dos monômeros de açúcares que o compõe (Método de Uppsala) captura os compostos orgânicos em ingredientes vegetais que são indigeríveis por enzimas endógenas de monogástricos e representam o conteúdo real de fibra desses ingredientes para esses animais (CHOCT, 2015).

TABELA 2.1 – COMPOSIÇÃO FIBROSA (%) CONFORME METODOLOGIA DE DETERMINAÇÃO DE FIBRA BRUTA, FIBRA EM DETERGENTE NEUTRO (FDN), FIBRA EM DETERGENTE ÁCIDO (FDA) E COMPOSIÇÃO DE POLISACARÍDEOS NÃO AMILÁCEOS TOTAIS E SOLÚVEIS (SOL) DE MILHO, FARELO DE SOJA E FARELO DE ARROZ. ADAPTADO DE ROSTAGNO, 2017.

Metodologia	Milho	Farelo de soja	Farelo de arroz
Fibra Bruta	1,73	4,86	7,71
FDN	13,8	13,6	22,5
FDA	3,16	7,76	12,3
Polissacarídeos			
Ramnose Total (Sol)	0,00 (0,00)	0,20 (0,07)	0,01 (0,01)
Fucose Total (Sol)	0,00 (0,00)	0,17 (0,07)	0,00 (0,00)
Arabinose Total (Sol)	1,55 (0,08)	2,39 (0,61)	3,49 (0,28)
Xilose Total (Sol)	2,07 (0,05)	1,53 (0,20)	4,09 (0,12)
Manose Total (Sol)	0,24 (0,11)	0,97 (0,44)	0,39 (0,23)
Galactose Total (Sol)	0,54 (0,08)	3,92 (1,06)	1,13 (0,23)
Glicose Total (Sol)	2,34 (0,46)	4,84 (0,33)	6,40 (0,47)
Ác. Urônicos Totais (Sol)	0,09 (0,07)	2,44 (1,07)	0,30 (0,22)
Total (Sol)	8,39 (0,85)	16,46 (3,85)	15,81 (1,56)

2.3.2 Classificação de tipos de fibras

Fibras presentes em ingredientes são geralmente classificadas de acordo com sua estrutura, composição e característica de solubilidade. Polissacarídeos não amídicos compõe a parede celular primária e secundária das células vegetais (KNUDSEN, 2014), sendo formada por compostos conhecidos como celulose e hemicelulose. Celulose é o composto orgânico mais abundante da natureza e é formado por um polímero linear de glicose com ligações β 1-4 (CHOCT, 1997). Essas cadeias de celulose se depositam lado a lado ligadas por pontes de hidrogênio e entremeadas por compostos diversos que são classificados de maneira unitária como “hemicelulose”.

O termo hemicelulose foi inicialmente aplicado pois pesquisadores acreditavam serem componentes que formariam a celulose (CHOCT, 2015). A concentração de hemicelulose em ingredientes pode ser calculada pela diferença na concentração de FDN e FDA, já que ambas análises determinam a presença de celulose e lignina e a diferença compõe basicamente a presença de hemicelulose. Entretanto, de um ponto de vista científico, essa classificação é inacurada, confusa e não faz sentido nutricional (CHOCT, 2015), já que dentro desse grupo determinado como hemicelulose existem compostos variados como arabinoxilanos, beta-glucanos, mananos, galactanos, entre outros.

Exemplo da estrutura da composição da parede celular vegetal é demonstrado na Figura 2.6.

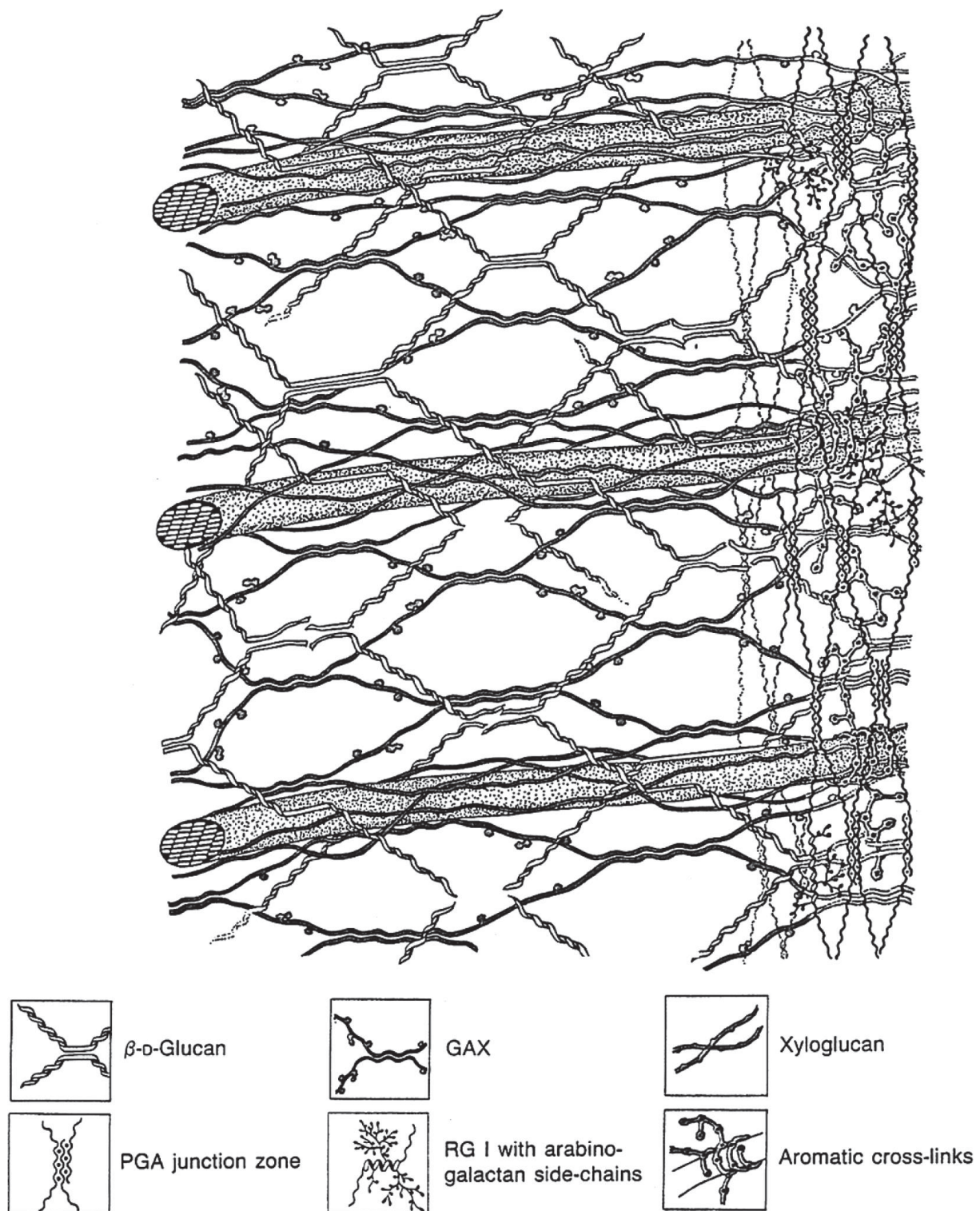


FIGURA 2.6 – MODELO DA PAREDE CELULAR VEGETAL DEMONSTRANDO A PRESENÇA DE FIBRAS DE CELULOSE ENTREMEADAS POR POLISACARÍDEOS NÃO AMÍDICOS. ADAPTADO DE KNUDSEN, 2014.

Segundo Choct (2015), a primeira referência sugerindo utilizar uma classificação dos polisacarídeos não amídicos em três grupos compostos por celulose, polisacarídeos não celulolíticos e polímeros de pectina foi feita por Bailey em 1973. Arabinoxilanos e beta glucanos são os principais polisacarídeos não celulolíticos presentes na parede celular de plantas monocotilêneas enquanto xiloglucanos representam a principal estrutura em células dicotiledoneas (KNUDSEN, 2014). A composição dessas estruturas é feita pela determinação da composição de pentoses e hexoses nos polisacarídeos após extração do amido e em seguida a composição é calculada a partir da quantidade de monômeros presentes (RAKHA et al., 2012). Dessa maneira, a composição de arabinose e xilose presente em uma extração é calculada como sendo a quantidade de arabinoxilano presente na mesma.

A caracterização do tipo de fibra em distintos ingredientes depende também de outros fatores como sua solubilidade e a quantidade de ramificações que apresentam. O número de ramificações pode afetar as propriedades viscoelásticas das fibras e a capacidade de formação de gel (IZYDORCZKY & BILIADERIS, 1995), fatores esses que afetam a mobilidade de nutrientes e enzimas dentro do trato gastrointestinal e, conseqüentemente, sua digestibilidade. Fibras com maior ramificação também apresentam menor capacidade de fermentação e são menos propensas à ação de enzimas fibrolíticas (RAKHA et al., 2012) e esses fatores são dependentes do tipo de ingrediente. CHOCT et al. (2010) sugerem que a solubilidade da fibra do farelo de soja em solução ácida é superior à solubilidade da fibra de milho na mesma solução.

2.3.3 Efeito da fibra no desempenho de frangos de corte

Mais do que uma questão acadêmica, a dificuldade na classificação e caracterização das fibras dos ingredientes e, conseqüentemente, das rações utilizadas na produção animal explica a variedade de resultados encontrados em trabalhos científicos quanto ao efeito das fibras no desempenho animal em geral e, especificamente, de frangos de corte. Como a descrição de fibra nos trabalhos científicos não é necessariamente a mesma (FDN, FDA, NSP, fibra buta, fibra dietética, etc.), ou, quando utilizando a mesma descrição é utilizada, essa não representa, necessariamente, o mesmo componente, de acordo com o tipo de ingrediente utilizado (FDN do milho, por exemplo, é diferente de FDN da soja), variações de respostas descrevendo o uso de “fibra” na nutrição de frangos de corte apresentando resultados diversos e até mesmo antagônicos não são surpreendentes.

Frangos de corte apresentam baixa digestibilidade de fibra. Dessa maneira, ingredientes e rações com alta concentração de fibra apresentam efeito de diluição dos outros nutrientes e energia presentes, reduzindo assim a concentração dos mesmos. Consequentemente, o desempenho de animais recebendo rações com alta concentração de fibra é reduzido em comparação com aqueles com níveis mais baixos de fibra.

Polissacarídeos não amídicos são, proporcionalmente, o maior grupo de componentes com características anti-nutricionais presentes em rações (YEGANI e KORVER, 2008). Diferentes polissacarídeos não amiláceos apresentarão características distintas mas as principais características comuns desses compostos que geram efeitos anti-nutricionais são a resistência às enzimas digestivas e formação de solução viscosa, ambos fatores que afetam a capacidade de movimentação de moléculas (YEGANI e KORVER, 2008) e consequentemente afetando a digestibilidade de nutrientes.

Segundo KRAS et al. (2013), o aumento da inclusão de fibra mediante inclusão de farelo de trigo e em rações para frangos de corte reduz a digestibilidade de matéria seca, matéria orgânica, energia bruta e fibra em detergente neutro mas aumenta a digestibilidade de fibra em detergente ácido enquanto a digestibilidade de proteína não é afetada. Por sua vez, JIMENEZ-MORENO et al. (2009) observaram aumento da retenção de matéria seca, matéria orgânica e nitrogênio de frangos alimentados com alta concentração de fibra insolúvel (casca de cevada) mas não com fibra solúvel (polpa de beterraba) em comparação à animais alimentados com uma ração controle. Entretanto, nessa avaliação animais controle tinham alta inclusão de sepiolita (fonte de minerais inerte utilizado como diluente mas que pode afetar absorção de outros nutrientes como vitaminas), na formulação da ração, o que pode ter afetado o resultado dos mesmos.

A utilização de compostos fibrosos apresenta efeito direto no desenvolvimento do trato intestinal e tempo de transito da digesta, esse efeito que dependerá, do tipo de fibra utilizado. A presença de fibra insolúvel apresenta maior resistência à moagem, gerando aumento do tamanho da moela pelo maior desenvolvimento da musculatura do órgão (JIMENEZ-MORENO, et al., 2009). Por sua vez, a presença de fibra solúvel aumenta a capacidade de retenção de água da digesta e seu volume, gerando assim maior pressão sobre a parede dos órgãos e o aumento de seu tamanho (JIMENEZ-MORENO et al., 2009). Esses resultados foram também observados por STEF et al. (2011) que observaram aumento do tamanho do duodeno, jejuno e íleo e da espessura da parede da moela de frangos alimentados com 60% de cevada (ingrediente com alta concentração de fibra solúvel) na formulação da ração. Por outro lado, SACRAINE et al. (2012) observaram que o impacto do aumento do tamanho da moela de frangos alimentados com casca de

cevada e aveia era reduzido quando essa inclusão era feita com partículas finamente moídas, confirmando que esse efeito não depende apenas da presença da fibra mas também pelo efeito físico do maior tamanho de partícula no desenvolvimento da moela, possivelmente devido ao tamanho estimular o processo de moagem e, conseqüentemente, sua hipertrofia.

Além do tamanho de órgãos, a morfologia intestinal também é afetada pela adição de fibra. REZAEI et al. (2011) observaram que a inclusão de 3 a 5kg/ton de fibra insolúvel purificada reduziu linearmente a relação entre o tamanho do vilos e das criptas intestinais e aumentou linearmente a concentração de células de caliciformes nas vilosidades. Segundo os autores, o aumento da relação vilos/cripta determina maior área para absorção de nutrientes e, conseqüentemente, maior capacidade de absorção. Essa, entretanto, pode ser uma resposta animal à menor densidade energética da dieta, fazendo com que o animal busque aumentar a área de absorção de nutrientes. Além disso, a maior concentração de células caliciformes expressam maior produção de muco, resposta protetiva à presença de compostos agressivos no trato gastrointestinal.

As fibras presentes na dieta, uma vez que não são digeridas e absorvidas no intestino delgado, servem como substrato para o crescimento bacteriano presente na parte distal do trato gastrointestinal (KUMAR et al., 2012). O produto desse processo de fermentação na porção posterior do trato gastrointestinal é a produção de ácidos graxos voláteis como ácido acético, propiônico e butírico que promovem efeitos benéficos para a saúde intestinal tais: como a redução do pH do ceco e cólon; a inibição do crescimento de organismos patogênicos e formação de toxinas; aumento da absorção de minerais; prevenção de diarreias osmóticas; estímulo à secreção pancreática e de hormônios intestinais e; o estímulo à proliferação de enterócitos, entre outros (KUMAR et al., 2012). Segundo GOODLANT et al. (1987), o fornecimento de fibra estimula a proliferação de enterócitos e a produção de ácidos graxos voláteis no lumen intestinal, esse efeito proliferativo seria não apenas local mas também na parte anterior do intestino devido à liberação de hormônios intestinais como enteroglucagon e peptídeo PYY. Esses hormônios atuam reduzindo a motilidade intestinal e gástrica, assim como o consumo de alimento em humanos (CHAUDHRI et al., 2006), o que possibilitaria um maior tempo para a digestão e absorção dos alimentos.

A composição da microbiota presente na porção posterior do trato gastrointestinal depende do tipo, quantidade e proporção de substrato presente para fermentação nesse sítio. Como exemplo, amido é um substrato mais facilmente fermentável por bactérias presentes no trato gastrointestinal quando comparado com fontes de fibra (DE VRIES,

2014). Dessa maneira, a presença de amido recalcitrante (amido resistente à digestão na parte superior do trato gastrointestinal) na porção posterior do trato gastrointestinal estimula o desenvolvimento de microrganismos mais propensos à fermentação de amido e na ausência desse substrato, a presença de compostos fibrosos do trato de suínos estimula a colonização do trato com bactérias que possuam atividade fibrolítica (DE VRIES, 2014).

A utilização de pentoses solúveis em água purificadas modificou a composição da microbiota de frangos de corte alimentados com uma dieta a base de milho e farelo de soja (SHENG et al., 2013). Os autores observaram um aumento na proporção de lactobacilos aos 5, 10 e 15 dias de idade e streptococos aos 5 dias de idade mas a quantidade de *Escherichia coli* não foi afetada. Já DE MAESSCHALCK et al., (2015) observaram que o fornecimento de xilo-oligosacarídeos para frangos de corte aumentou a abundância de bactérias produtoras de butirato no ceco e lactobacilos no colon de frangos de corte.

A composição e atividade da microbiota do trato gastrointestinal afeta a imunidade (CORTHEY et al., 2007). Dessa maneira, como a composição de fibra da dieta afeta a composição da microbiota intestinal, conseqüentemente tem influência sobre a imunidade desses mesmos animais. Em uma avaliação em frangos de corte, CHOCT et al. (2006) forneceram uma ração à base de trigo e observaram um alto teor de viscosidade no trato gastrointestinal. Porém, quando estes receberam a mesma ração suplementada com uma xilanase (enzima que rompe as cadeias de arabinoxilanos) essa viscosidade intestinal foi reduzida, aumentando o valor de energia metabolizável da dieta e reduzindo tanto a quantidade de bactérias como a quantidade de *Clostridium perfringis* na digesta. Por sua vez, ADEDOKUM et al. (2012) observaram uma redução na concentração de aminoácidos no íleo de frangos de corte alimentados com uma dieta de alta fibra (8%) em relação à uma dieta de baixa concentração de fibra (3,5%) mediante a inclusão de uma fonte de celulose purificada. A diferença no fluxo de aminoácidos endógenos foi maior, em animais que haviam sido desafiados com uma infecção de *coccidias*, sustentando que a alta concentração de fibra na dieta pode ter auxiliado a imunidade animal frente à esse desafio.

O efeito da adição de fibras e a dicotomia de resultados positivos e negativos frente à essa adição para monogástricos foi resumida por BEDFORD e WALK (2017). Segundo os mesmos, a adição de fibra à ração pode trazer efeitos antinutricionais devido ao aumento de viscosidade intestinal e dificuldade de absorção de nutrientes gerada diretamente pela presença da fibra como também por essa maior dificuldade

gerada pela viscosidade da digesta. Essa mesma fibra, entretanto, quando presente na porção posterior do trato gastrointestinal estimula o crescimento de bactérias e a produção de ácidos graxos voláteis que trazem efeitos benéficos para a saúde intestinal do animal.

2.3.4 Farelo de arroz

Farelo de arroz é um coproduto do beneficiamento do arroz para consumo humano, sendo composto da camada intermediária entre a casca e o endosperma do grão (DADALT, 2012). É formado pelo pericarpo, testa, aleurona e germen do grão, além de concentrações variáveis de amido e representa entre 4 e 12% do peso inicial do grão (DADALT, 2012). O valor bromatológico do farelo de arroz é variável e dependerá do processo de beneficiamento e polimento do grão para consumo humano mas se caracteriza por ser um ingrediente de alto conteúdo de gordura e fibra. Segundo ROSTAGNO et al. (2017) o farelo de arroz apresenta em sua composição um teor de proteína bruta entre 12,3 e 14,3%, extrato etéreo entre 12,55 e 15,85% e fibra em detergente neutro entre 20,8 e 24,2% e valor energético para aves entre 2291 e 2875kcal/kg.

A utilização de farelo de arroz na formulação de rações é bem difundida em aves de postura mas em menor grau para frangos de corte devido aos componentes antinutricionais presentes em sua composição. Esses componentes antinutricionais podem ser caracterizados pela alta concentração de extrato etéreo rapidamente rancificável, alta concentração de fitato, afetando a absorção de minerais como fósforo, cálcio e zinco e proteínas, e a alta concentração de fibra, o que dilui os outros nutrientes da dieta (ROCHA, 2014). Segundo ROSTAGNO et al. (2011), a inclusão de farelo de arroz na formulação de rações para frangos de corte não deve ultrapassar 8% na fase inicial e 12% na fase de crescimento.

CONTE et al. (2003) observaram redução no desempenho de frangos de corte alimentados com dietas contendo 15% de farelo de arroz em relação à uma dieta padrão sem inclusão desse ingrediente. Nessas dietas, entretanto, não foi considerada a baixa disponibilidade do fósforo presente nesse ingrediente. Quando esse efeito foi corrigido mediante à inclusão de fitase (enzima que hidrolisa o fitato e aumenta a disponibilidade de fósforo para absorção), o desempenho e mineralização óssea das aves foi semelhante ao grupo controle. Ainda neste experimento, os autores verificaram que a conversão alimentar aos 21 dias de idade se manteve pior que a conversão alimentar dos animais que receberam a ração controle sem adição de farelo de arroz. Da mesma forma, a

inclusão de 25% de farelo de arroz reduziu o desempenho de frangos de corte medido por menor ganho de peso e piora de conversão alimentar entre 1 e 21 dias de idade além de reduzir a digestibilidade de matéria seca e energia bruta (ROCHA, 2014). Além disso, farelo de arroz aumentou o peso relativo do intestino delgado aos 7 e 21 dias de idade, o que pode estar relacionado, segundo ROCHA (2014), à alta concentração de fibra nessa matéria prima.

2.4 BETAINA NA NUTRIÇÃO DE AVES

2.4.1 Betaína: estrutura e classificação

Betaína é o nome comum utilizado para a trimetilglicina, composto derivado do aminoácido glicina. O mesmo composto também é conhecido como betaina-glicina, licina e oxineurina (CRAIG, 2004). Sua estrutura é formada por três grupos metil quimicamente reativos ligados à uma molécula de glicina (SILJANDER-RASI et al., 2003; Figura 2.7).

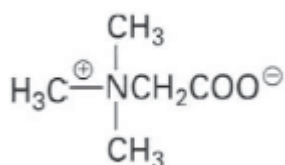


FIGURA 2.7 – ESTRUTURA QUÍMICA DA BETAÍNA CONTENDO TRÊS GRUPOS METILA (CH₃). ADAPTADO DE LEVER ET AL, 2010.

A betaína foi inicialmente isolada da beterraba açúcareira por Scheibler, de onde vem seu nome, na década de 1860 (LEVER et al., 2010). Além da beterraba açúcareira, a presença de betaína também já foi determinada, porém em menores concentrações, no trigo, ervilha, cevada, aveia entre outros ingredientes utilizados em nutrição animal e sua presença está normalmente associada em essas plantas à mecanismos de defesa frente à desafios de estresses hídricos (EKLUND et al., 2005). Em microrganismos e organismos aquáticos, sua presença também é estimulada frente à estresses hídricos, térmicos e de salinidade (CRAIG, 2004). Em organismos vertebrados, o acúmulo de betaína em células renais e macrófagos é estimulado em casos de hiperosmolaridade (KETTUNEN et al., 2001a).

A betaína é classificada como um *zwitterion* (apresenta cargas elétricas positivas e negativas em sua molécula, mas é eletricamente neutro) e altamente solúvel em água (EKLUND et al., 2005). Por apresentar grupos imino (>C=NH) e carboxil (-C(=O)-OH) em sua estrutura, a betaína pode também ser classificada como um iminoácido, classificação

considerada obsoleta mas ainda presente na literatura (BROER, S, 2008; THWAITES e ANDERSON, 2007). A betaína se caracteriza como um osmolito competitivo, evitando a desnaturação de proteínas em situações de variação de osmolaridade e classificando-a como uma chaperona química (SCHWAHN et al., 2003). Chaperonas são uma classe de moléculas com função de estabilizar e evitar a desnaturação assim como reorganizar moléculas protéicas que tenham sido desnaturadas provendo proteção às células em estresse (CONTE et al., 1999). A extração de betaína da beterraba, como um produto da produção de açúcar, junto com sais de betaína desenvolvidos por síntese química, são as principais fontes de betaína utilizados comercialmente (REZENDE, 2015).

2.4.2 Farmacologia da betaína

O aporte de betaína no organismo animal pode ser obtido tanto pelo consumo de alimentos ricos em betaína como a partir de sua formação a partir da oxidação da colina. O processo de formação de betaína a partir da colina, entretanto, depende do transporte da colina para dentro da mitocôndria, onde a colina é oxidada em betaína aldeído pela ação da colina oxidase e a seguir desidrogenada em betaína pela ação da betaína aldeído desidrogenase (KIDD et al., 1997). A oxidação de colina em betaína, não é um processo altamente eficiente em aves, o que é atribuído à utilização de coccidiostáticos ionóforos na sua alimentação, o que inibe o transporte transmembrana mitocondrial da colina e afeta a atividade da colina oxidase (EKLUND et al., 2005). Além disso, o aporte de colina é utilizado preferencialmente para biosíntese de acetilcolina (neurotransmissor) e fosfatidilcolina (integridade intestinal) que para sua oxidação em betaína (DILGER et al., 2007).

Além da biossíntese a partir da oxidação intramitocondrial da colina, a betaína pode ser obtida via alimentação. Ingredientes apresentam concentrações variadas de betaína. Dos ingredientes comumente utilizados na produção de ração para aves, o trigo é aquele que apresenta concentrações de betaína mais expressivas, variando entre 1400 e 2600mg/kg no trigo grão e farelos de trigo, respectivamente (KIDD et al., 1997). Outros ingredientes como milho e farelo de soja apresentam concentrações abaixo dos limites de detecção dos métodos utilizados para sua determinação (EKLUND et al., 2005). Betaína também é disponível como aditivo de forma purificada como betaína anidra, betaína monofosfato e cloreto de betaína (EKLUND et al., 2005)

Uma vez presente no trato gastrointestinal, a absorção de betaína ocorre primeiramente no duodeno, tanto por transporte ativo associado à sódio e cloro como transporte passivo independente do transporte de sódio. O fornecimento de betaína

purificada aumenta a concentração de betaína no lumen intestinal e aumenta o transporte dependente de sódio (KETTUNEN et al., 2001b). Por ser um aminoácido N-metilado (anteriormente classificado como imino ácido), a absorção de betaína ocorre por sistemas de transporte utilizados também para absorção de outros aminoácidos (CRAIG, 2004), como prolina e glicina (THWAITES e ANDERSON, 2006). Os principais transportadores na membrana apical do enterócito intestinal são o PAT1 e IMINO, enquanto na membrana basolateral o transporte ocorre pelo transportador GABA/betaina BGT1 (THWAITES e ANDERSON, 2006; BROER, 2008). A presença desses transportadores também varia de acordo com o órgão alvo. Transportador GABA/Betaína não está presente no enterócito do intestino (SATSU et al., 1999), fazendo da betaína presente no lumen intestinal a principal fonte de betaína para essas células.

Uma vez presente no lumen intestinal, a betaína é rapidamente absorvida no duodeno. Sua absorção é mais rápida que de outras fontes de grupo metila como colina e metionina, além disso, o transporte de betaína no sangue ocorre através da fração aquosa enquanto destas outras fontes ocorre principalmente associada à lipoproteínas plasmáticas (KETTUNEN et al., 2001b). Uma vez absorvida a betaína é acumulada no fígado, rins e intestino (KETTUNEN et al., 2001c; KEMPSON et al., 2014). Tanto no rim como no fígado, o acúmulo de betaína se dá mediante a ativação e transcrição do transportador GABA/betaina (BGT1) (KEMPSON et al., 2014). No caso do rim esse acúmulo se dá devido à variações de osmolaridade no sangue e urina, como mecanismo de osmoproteção (KEMPSON et al., 2014), possivelmente sendo o mesmo quadro para o acúmulo intestinal (KETTUNEN et al., 2001a). No fígado, apesar de mecanismos de osmoproteção não poderem ser totalmente excluídos, a alta concentração de betaína parece estar associada à necessidade de fontes de grupos metila para transmetilação de outros compostos e proteção hepática (KEMPSON et al., 2014).

A concentração plasmática muda rapidamente após ingestão de betaina mas a excreção renal como betaína é pequena, sendo esta eliminada basicamente através da formação de metabólitos como a dimetil glicina (SCHWAHN et al., 2003). Segundo estes mesmos autores, a excreção urinária de betaína compreende apenas 4% do volume absorvido. Em humanos saudáveis, a meia vida de absorção, distribuição e eliminação de betaína é de aproximadamente 17 minutos, 35 minutos e 14 horas, respectivamente, após uma dose única de betaína. Quando o fornecimento é feito de maneira constante, a meia vida de absorção, distribuição e eliminação aumenta para 41 minutos, 1 hora e 46 minutos e 41 horas respectivamente.

2.4.3 Funções da betaina no metabolismo animal

Os primeiros trabalhos avaliando a utilização de betaina para alimentação de frangos de corte foram desenvolvidos na década de 40 do século passado. Autores forneceram dietas semi-purificadas para frangos e observaram melhor ganho de peso e redução de quadros de perose, entretanto esses efeitos positivos eram reduzidos quando os animais recebiam colina e betaina em conjunto (KIDD et al., 1997). Betaina atua de duas formas no metabolismo animal: doando radicais metil e atuando como osmoprotetor em situações de hiperosmolaridade (BARBOSA et al., 2013). Ambas funções metabólicas afetam de maneira distinta o metabolismo de frangos de corte e influenciaram a resposta obtida pela presença de betaina no alimento, dependendo da situação à qual o animal está exposto. Devido a isto, dados de literatura demonstram efeitos distintos do uso de betaina na nutrição animal tais como redução do requerimento de metionina e colina, melhoria de qualidade de carcaça e redução de deposição de gordura, melhoria de desempenho em situações de estresse térmico, osmoprotetor, redução de quadros de coccidiose entre outros.

2.4.3.1 Betaina como doador de grupos metila

O processo de de doação de grupos metila pela betaina segue descrito na Figura 2.8. Betaína pode ser sintetizada intracelularmente pela oxidação da colina ou ser absorvida através da corrente sanguínea, pelo transportador GABA/Betaína. Em uma reação mediada pela betaína homocisteína metiltransferase, um grupo metil é transferido da betaína para a homocisteína, formando metionina e dimetilglicina.

A dimetilglicina por sua vez pode ser transportada para a corrente sanguínea e então filtrada para a urina onde é excretada ou também transportada para dentro da mitocôndria onde é oxidada em sarcosina, transferindo um grupo metila para o tetrahydrofolato e formando sua estrutura metilada. A sarcosina pode também ser demetilada pela sarcosina dehidrogenase, transferindo o último grupo metila para a tetrahydrofolato e formando uma molécula de glicina.

Dimetilglicina somente é formado pela metilação de metionina a partir da homocisteína pela via da betaína, sendo um marcador dessa rota metabólica dentro do organismo (LEVER et al., 2010). Ambas moléculas de metil-tetrahydrofolato, formado a partir da demetilação da dimetilglicina em glicina dentro da mitocôndria, podem entretanto servir também como fonte de grupo metil para a formação de metionina a partir da ação da metionina sintetase associada à vitamina B12 (Figura 2.8). KALMAR et al. (2014) observaram que frangos de corte que receberam 1kg/ton de dimetilglicina na ração obtiveram melhor ganho de peso em um de três experimentos, melhor conversão

alimentar em dois de três experimentos e redução na deposição de gordura na carcaça de um em três experimentos quando comparados com frangos de corte recebendo a mesma ração sem adição de dimetilglicina. A metionina, por sua vez, sofre ação da metionina adenosiltransferase formando S-adenosilmetionina, um dos principais compostos metiladores presentes nas células (EMMERT et al., 1996). Processos de metilação são importantes mecanismos de detoxificação, síntese de proteínas, creatinina, fosfolipídeos, hormônios, poliaminas, carnitina, adrenalina e metilação de DNA (CRAIG, 2004). A doação de grupos metila pela S-adenosilmetionina acaba formando homocisteína, fechando o ciclo de metilação de compostos. PILLAI et al. (2006) observaram que em dietas com baixa concentração de metionina a remetilação através da betaina-homocisteína metiltransferase compreendem a maior proporção da metionina remetilada no fígado, essa proporção, entretanto, reduz com o fornecimento de betaina, metionina ou colina, demonstrando a eficiência de ambos mecanismos de remetilação da homocisteína e que esse processo de remetilação depende do aporte de grupos metil, mais que de compostos específicos.

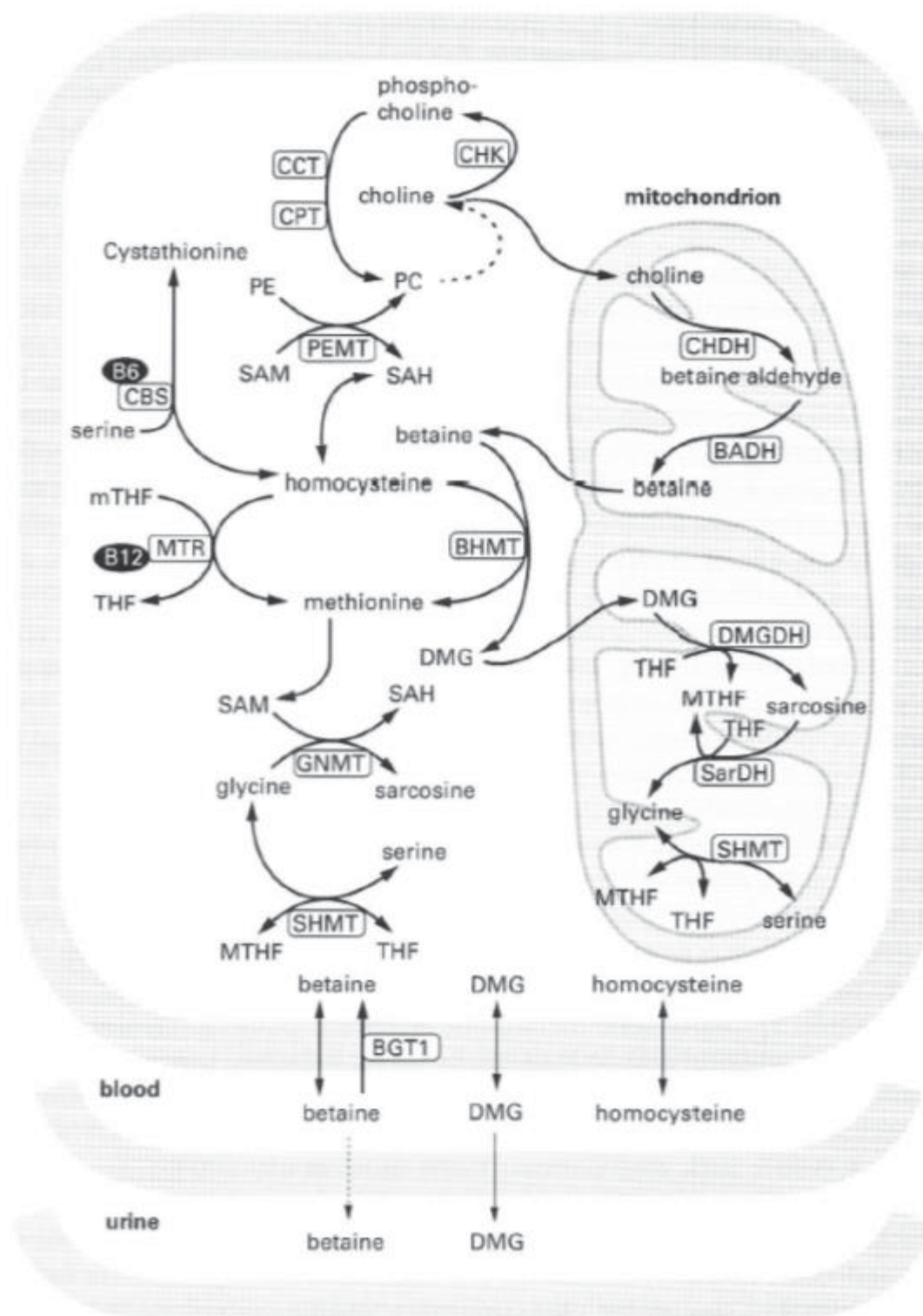


FIGURA 2.8 – METABOLISMO DA BETAÍNA. ADAPTADO DE LEVER ET AL, 2010.

Um dos principais usos da Betaína na alimentação de frangos de corte é como doador de grupos metila, facilitando assim a doação de grupos metila para a homocisteína e assim reduzindo a necessidade de inclusão de metionina e colina na formulação das rações (REZENDE, 2015). A literatura, entretanto, apresenta resultados

inconsistentes em relação à essa abordagem, com trabalhos demonstrando a possibilidade de substituição (BARBOSA et al., 2013; SAKOMURA, et al., 2013; REZENDE, 2015) e outros descrevendo a ineficiência dessa abordagem (MCDEVITT et al., 2000; ESTEVE-GARCIA e MACK, 2000; WALDROUP et al., 2006; FU et al., 2016).

Segundo DILGER et al. (2007), a suplementação de betaina reduz a necessidade de colina pelo animal, mas essa redução apenas ocorre quando uma quantidade mínima de colina é adicionada à dieta. Isso ocorre pois a betaina substitui apenas a colina como fonte de grupos metil para processos metabólicos inerentes do organismo animal, mas não a colina como fonte para formação de transmissores celulares (acetilcolina) e formação de membranas (fosfatidilcolina). O mesmo ocorre para metionina já que a suplementação de betaina não substitui a metionina como aminoácido para síntese protéica.

Em humanos, o fornecimento de betaina aumentou a resistência muscular ao exercício, o que, segundo os autores, pode estar relacionado ao aumento dos níveis de creatina muscular (HOFFMAN et al., 2009), influenciando assim o metabolismo energético. Avaliações em animais consumindo alimentos com alta inclusão de gordura observaram que níveis de esteatose eram reduzidos com a presença de betaina no alimento afetando o metabolismo energético, a formação de carnitina e secreção de VLDL (CRAIG, 2004). Maior síntese de carnitina estaria relacionado com o maior transporte de cadeias de ácidos graxos longos para o interior da mitocôndria, possibilitando sua oxidação e maior liberação de energia (LIPINSKI et al., 2012).

Segundo EKLUND et al. (2005), o aumento da deposição de carne magra e menor deposição de gordura em frangos que receberam betaina está associada ao maior aporte de metionina e glicina associada à doação de grupos metila pela betaina. A maior disponibilização desses aminoácidos aumentaria a deposição de proteína reduzindo assim a quantidade de aminoácido disponível para desaminação e síntese de tecido adiposo. Além disso, a glicina pode ser utilizada como precursor de cistina, aumentando a utilização de outros aminoácidos (POWELL et al., 2009)

KETTUNEN et al. (2001b) avaliaram a distribuição de betaina, colina e metionina com carbono marcado atômica e observaram que o carbono da betaina apresentava maior acúmulo no fígado enquanto aqueles da metionina e colina apresentavam acúmulo também no rim e jejuno. Quando a presença desses compostos foi fracionada entre a porção aquosa, lipídica e protéica do tecido muscular, hepático e jejuno, observou-se que o carbono da betaina apresentava maior concentração na porção aquosa do músculo, uma proporção intermediária nos lipídeos e cerca de 20% na

proteína. Carbono oriundo da colina apresentava maior concentração na porção lipídica dos três órgãos enquanto carbonos oriundos da metionina apresentavam maior proporção na porção protéica porém alta concentração também na porção aquosa do jejuno e na porção lipídica da musculatura (Figura 2.9). Segundo os autores, os dados demonstram como os grupos metil são distribuídos de maneira diferente dependendo da origem da molécula, representando suas funções específicas no metabolismo de frangos de corte. Grupos oriundos da betaína estão em maior quantidade presente na porção aquosa, possivelmente apresentando efeito osmoprotetor, da colina na porção lipídica como parte formadora de membranas e da metionina na porção protéica, como integrante na formação de proteínas (KETTUNEN et al., 2001b).

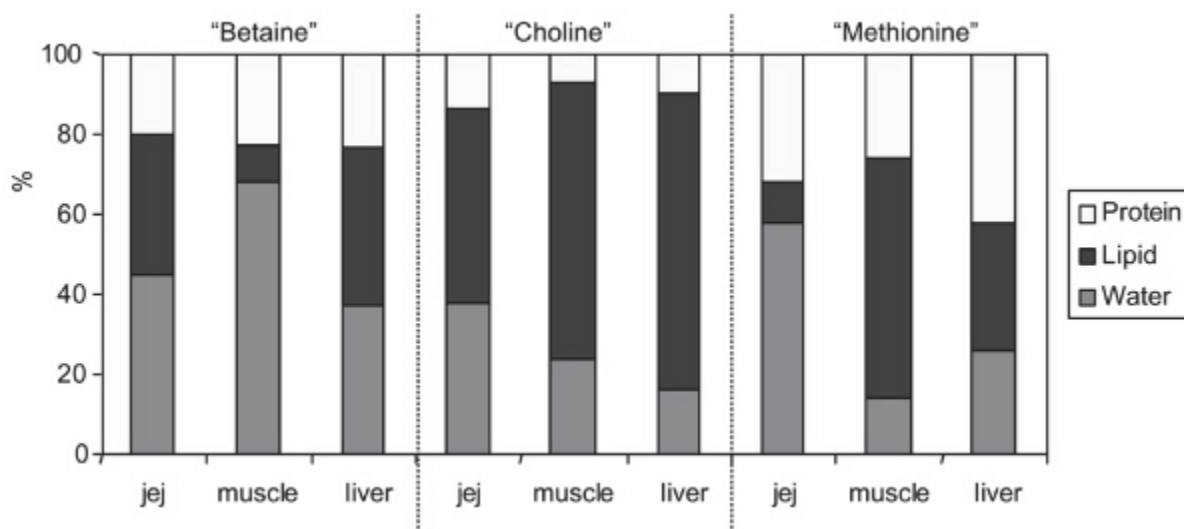


FIGURA 2.9 – PERCENTUAL DE PROPORÇÃO DE PRESENÇA DE CARBONO EM DIFERENTES FRAÇÕES (AQUOSA, LIPÍDICA E PROTÉICA) DE JEJUNO, MUSCULO CARDÍACO E FÍGADO DE FRANGOS DE CORTE 24 HORAS APÓS ALIMENTAÇÃO COM BETAÍNA, COLINA E METIONINA CONTENDO CARBONO MARCADO. ADAPTADO DE KETTUNEN ET AL, 2001B.

2.4.3.2 Betaina como composto osmoprotetor

Em organismos unicelulares, vegetais e animais aquáticos o aumento de concentração de betaína intracelular está associada à quadros de estresse osmótico (EKLUND et al., 2005). Esses quadros de alta osmolaridade podem estar relacionados à períodos de seca, no caso de organismos vegetais (EKLUND et al., 2005), como quadros de variação de salinidade no caso de animais aquáticos (YANCEY et al., 1982). Como mecanismos de proteção contra essas variações ambientais, as células lançam mão do acúmulo de osmólitos intracelulares. Osmólitos são substâncias de baixo peso molecular, tanto ions inorgânicos como moléculas orgânicas de baixo peso molecular que são

produzidas ou absorvidas pelas células em condições adversas para buscar a manutenção do volume celular (YANCEY et al., 1982). Osmólitos orgânicos podem ser classificados de acordo com sua origem como açúcares e derivados de açúcares, aminoácidos ou compostos com grupos metil ou amônio ou de acordo com seu efeito sobre proteínas funcionais como compatíveis ou antagônicos (BOWLUS & SOMERO, 1979).

Osmólitos compatíveis aumentam a estabilidade de proteínas contra a desnaturação, sem efeito em suas funções biológicas enquanto osmólitos antagônicos além de aumentar a estabilidade protéica possuem capacidade de reduzir os efeitos deletéreos da uréia na atividade catalítica de enzimas celulares (GONNELLI & STRAMBINI, 2001). Exemplos de osmólitos compatíveis incluem certos tipos de aminoácidos como prolina e glicina e açúcares como sucrose e sorbitol enquanto compostos com grupos metil presente são caracterizados como osmólitos antagônicos (YANCEY et al., 1982). A exclusão preferencial do osmólito da superfície de um polímero gera a energia necessária para evitar a desnaturação protéica e a manutenção de estruturas quaternárias, reduzindo assim o contato da água com a superfície da proteína (GONNELLI & STRAMBINI, 2001). Atuando como se uma chaperona química (SCHWAHN, et al., 2003).

A betaína é considerada um osmoprotetor antagônico pois além de evitar a perda hídrica das células em um ambiente de alta osmolaridade também auxilia na manutenção das características terciárias e quaternárias de proteínas, evitando sua desnaturação e fazendo assim com que essas proteínas mantenham sua atividade em ambientes com alta concentração de uréia (BOWLUS & SOMERO, 1979; ARAKAWA & TIMASHEFF, 1985). Esse efeito não ocorre diretamente pela interação entre uréia e a betaina, caracterizando que seu efeito estará presente mesmo em soluções em que alta concentração de uréia não está presente (BASKAKOV et al., 1998). Betaina apresenta ainda a habilidade extraordinária de evitar a desnaturação de proteínas termodinamicamente instáveis, porém, sem afetar sua flexibilidade e consequentemente sua atividade (GONNELLI & STRAMBINI, 2001).

O aumento da concentração intracelular de betaína gerado em quadros de hiperosmolaridade ocorre devido ao aumento na absorção de betaina presente na corrente sanguínea, aumento da produção via oxidação de colina e redução na degradação de betaína e doação de grupos metila. Tanto o transportador BGT1 como a enzima colina desidrogenase apresentam atividade aumentada em situações de alta osmolaridade (KEMPSON et al., 2014). Por sua vez, a atividade de betaina oxidase é

reduzida em quadros de alta osmolaridade, mantendo assim alta concentração de betaina intracelular e reduzindo a doação de grupos metila para a formação de metionina a partir da homocisteína (CRAIG, 2004), por outro lado, entretanto, pode reduzindo o ciclo de remetilação de homocisteína em metionina e S-adenosilmetionina. Quadros de alta osmolaridade estão relacionados a quadros da alta concentração sanguínea de homocisteína e baixa concentração de dimetilglicina, um quadro de risco de doenças cardíacas em humanos (SCHWAHN et al., 2003).

O tecido renal, hepático e enterócitos intestinais estão entre as células cujo desafio osmótico é mais exacerbado (KETTUNEN et al., 2001a). Esse desafio pode ser decorrente do aumento ou redução do volume celular e sua regulação depende do transporte de osmolitos orgânicos e inorgânicos que são acumulados ou transportados para dentro ou fora da célula. A alta concentração de nutrientes no lúmen intestinal gera um quadro de hiperosmolaridade gerando uma pressão para a saída de líquidos para o lúmen intestinal (KETTUNEN et al., 2001a). O mesmo ocorre no túbulo renal distal em que a alta concentração de sais e ureia na urina gera o mesmo tipo de força osmótica (EKLUND et al., 2005) e no tecido hepático, onde a betaina atua como um potente osmoprotetor contra quadros de apoptose gerados pelo acúmulo de ácidos biliares nas células (GRAF et al., 2002).

Quadros de hiperosmolaridade estão associados à respostas inflamatórias como a liberação de interleucinas pró-inflamatórias e a presença de células de defesa (SCHWARTZ et al., 2009) podendo levar à desencadear mecanismos de apoptose e aceleração no processo de renovação celular (ALFIERI et al., 2002). Quando na presença de uma solução hiperosmótica (450mOsm/l) ou hipoosmótica (150mOsm/l) enterócitos humanos em cultivo celular aumentam a produção de interleucina-8 e interleucina-6 em comparação à células em solução com padrão normal de osmolaridade (310mOsm/l) independente da presença ou ausência de outras citocinas inflamatórias na solução (HUBERT et al., 2004). Em humanos, por exemplo, quadros de colite ulcerativa depende de um quadro de alta osmolaridade na parte posterior do intestino gerando a metilação da proteína fosfatase 2A e ocasionando então a resposta inflamatória (SCHWARTZ et al., 2008). A presença de um sistema de proteção osmótica com osmoprotetores como a betaina (ALFIERI et al., 2002) pode auxiliar a manutenção de órgão e tecidos mais afetados por quadros de variação de osmolaridade auxiliando a manutenção de sua funcionalidade.

Animais alimentados com ração com adição de betaina apresentam maior altura de vilo do que aqueles alimentados sem adição de betaina quando criados em um ambiente

com alta temperatura (BARBOSA et al., 2013) . Durante períodos de alta temperatura a digestibilidade e a capacidade de absorção de nutrientes é reduzida (AHMED, 2013), criando um ambiente de alta osmolaridade. SAYED e DOWNING (2011) observaram que a utilização de fluidos reidratantes compostos por glucose e sais minerais apresentaram capacidade de recuperar o desempenho de aves sobre estresse calórico e essa resposta era exacerbada na presença de betaína, sustentando seu efeito sobre a manutenção da capacidade de absorção de nutrientes. O desempenho de patos criados sob estresse térmico melhorou com a presença de betaína na ração mantendo padrões de parâmetros bioquímicos sanguíneos e ambiente intestinal semelhante a animais em ambiente termoneutro (PARK e KIM, 2017). Outros trabalhos não observaram resultados positivos da utilização de betaina no desempenho de frangos de corte (SAKOMURA et al., 2013) mas em uma revisão de trabalhos a tendência é de observação de melhoria de resultados (RATRIYANTO et al., 2009).

Quadros de estresse térmico por alta temperatura estão associados, em frangos de corte ao aumento da taxa de ventilação e consequentemente aumento da perda de dióxido de carbono (CO₂), gerando um quadro de alcalose respiratória. A excreção de osmólitos como sódio, potássio e fósforo via renal é uma alternativa utilizada pelos animais na tentativa de corrigir esse problema e manter a osmolaridade sanguínea (BELAY et al., 1992). Junto com a excreção de sódio, de maneira concomitante devido à pressão osmótica gerada pela alta concentração desse mineral, ocorre aumento da perda de água e gerando assim um quadro de desidratação caso não seja possível ser compensado pelo aumento de consumo de água (MUSHTAQI et al., 2013). De qualquer forma, o aumento do consumo de água afetou a qualidade da cama e o bem-estar animal devido ao aparecimento de quadros como pododermatite e dificuldade de locomoção dos animais (MUSHTAQI et al., 2013). Além disso, o estresse térmico, por si só, também afetou quadros de resposta imune, estimulando a proliferação de linfócitos T e a secreção de interleucina 2, promovendo a ativação desses linfócitos (HAN et al., 2010). Betaína é um osmólito que se acumula nos tubulos distais do nefron atuando como um osmoprotetor e evitando assim a perda excessiva de água gerada pela alta osmolaridade da urina nesses tubulos, podendo dessa forma reduzir os quadros de estresse térmico e a desidratação causada por esse efeito ambiental (CRAIG, 2004).

Betaina é acumulada no trato gastrointestinal de frangos de corte mesmo em situações em que não está presente na dieta, mas sua concentração aumenta com sua presença, reforçando que seu efeito fisiológico como osmoprotetor intestinal (KETTUNEN et al., 2001a). Sua ação osmoprotetora pode ser parcialmente explicada pela ação sobre

a movimentação de água no epitélio intestinal, servindo como proteção em quadros de distúrbios osmóticos como presença de quadros diarreicos e ataque de parasitas (KETTUNEN et al., 2001a), além de quadros de baixa digestibilidade por estresse térmico.

Quadros de baixa digestibilidade podem também estar relacionados à problemas de infestação de parasitas, como no caso da presença de coccídias que são os organismos patogênicos mais comuns em aves. Quadros de coccidiose estão relacionados com redução da capacidade de absorção de alimentos devido à perda de área de contato e enterócitos para que esse processo ocorra (KETTUNEN et al., 2001a). Ainda, a presença de coccidiose gera uma resposta imune com o tropismo de células do sistema de defesa como macrófagos e leucócitos que atuam no combate à essa infecção e gerando um quadro inflamatório (KLASING et al., 2001). Animais alimentados com betaina e com desafios de coccidiose apresentam maior tamanho de vilosidade e capacidade de absorção de nutriente (KETTUNEN et al., 2001a). Além disso, KETTUNEN et al (2001a) observaram que animais com desafios de coccidiose que haviam sido alimentados com betaina apresentavam menor tamanho do intestino. Isso pode se dever ao fato que a coccidiose reduz a capacidade de absorção de nutrientes, no qual o animal responde aumentando o tamanho do intestino, compensando assim essa redução na área de absorção. A partir do momento que essa absorção é mantida, o aumento do tamanho do trato intestinal não é necessário e esses nutrientes podem ser utilizados para a manutenção do ganho de peso. Também avaliando respostas à quadros de coccidiose em animais alimentados com betaina, KLASING et al (2002) observaram que frangos de corte apresentam menor reação inflamatória em decorrência dessa infecção, possibilitando assim a recuperação mais rápida após o desafio. O mesmo não ocorre, entretanto, quando o fornecimento de betaina ocorre de maneira concomitante ao desafio de coccidiose (MATTHEWS e SOUTHERN, 2000). Caracterizando que, possivelmente, a betaina já deve estar dentro da estrutura dos enterócitos para gerar a resposta esperada.

Apesar de o tecido intestinal, hepático e renal serem tecidos alvos primordiais para o acúmulo de betaina, a mesma pode também estar presente no tecido muscular (EKLUND et al., 2005). O processo de transição de tecido muscular em carne depende de diversos fatores, incluindo variações de pH, para que haja o rompimento das cadeias de proteínas musculares e a formação da carne. Durante esse processo, exsudação da carne e consequentemente perda de umidade levam a perda de peso e qualidade pela formação de uma carne dura ou com característica exsudativa. Assim como o efeito presente em outros tecidos, a presença de betaina reduz a velocidade de formação de ácido láctico e a redução do pH reduzindo assim a desnaturação de proteínas (EKLUND et

al., 2005). Com isso, possibilita uma defesa contra a perda de água para o meio externo durante esse processo de formação da carne, evitando assim o aparecimento dessas características indesejáveis e melhorando o rendimento de carcaça (EKLUND et al., 2005). O fornecimento de betaína reduz a exudação de água durante a transformação de musculatura em carne em suínos (MATTHEWS et al., 2001). O fornecimento de betaina para frangos de corte melhora o ganho de peso e o rendimento de peito e reduz o peso relativo do fígado de frangos de corte independente do nível de metionina da dieta (RAMA RAO et al., 2011), o que demonstra que o efeito na qualidade de carcaça não está relacionado apenas com o efeito da betaina sobre a necessidade de uso de metionina como fonte doadora de grupos metila.

Por todas essas características da betaína como agente osmoprotetor competitivo, mantendo a estrutura de proteínas e sua funcionalidade mesmo em ambientes de alta osmolaridade, a betaína pode ser considerada um composto antioxidante. ALIREZAEI et al. (2012) observaram que o fornecimento de betaina em dietas com baixo nível de metionina reduz a peroxidação de lipídeos e melhora as defesas antioxidantes e a qualidade da carne de frangos. Esse efeito antioxidante é devido ao aumento da atividade de enzimas antioxidantes como glutadiona peroxidase, catalase e superoxidase dismutase (ALIREZAEI et al., 2012)

3 INFLUENCE OF FIBRE AND BETAINES ON THE DEVELOPMENT OF THE GASTROINTESTINAL TRACT OF BROILERS BETWEEN HATCH AND 14 DAYS OF AGE

3.1 ABSTRACT

An experiment was designed to determine the influence of fibre and betaine on intestinal development and adaptation and liver and pancreas development of broilers from hatch to 14 days of age. A total of 250 day old Cobb 500 male broilers were allocated to 16 cages with 15 broilers each. Treatments were arranged in a 2 x 4 factorial design, with 2 replicate cages per treatment. Treatments consisted of two feed formulations (low and high fibre diets (rice bran)) and 4 levels of betaine (0, 1, 3 or 5 kg/tonne). At hatch, 10 broilers were weighed, euthanized by cervical dislocation and liver, pancreas, yolk sac and intestine weighed prior to collection of samples from the duodenum. On days 4, 9 and 14, 5 birds/cage (10 birds/treatment) were selected, euthanized and treated as birds at hatch. Villus height and width and crypt depth were determined on the duodenum samples and absorptive area calculated. The number of enterocytes in mitosis at the villus was determined by a positive reaction to antibody for Ki67 protein and fused villus evaluated visually. Yolk sac ($P<0.05$) relative weight reduced as bird aged while intestinal and liver ($P<0.05$) reached a maximum around 4 d of age and pancreas at 9 d of age. Birds fed the high fibre diet had greater ($P<0.05$) feed intake, lower relative weight of pancreas and high villus. Villus width increased ($P<0.05$) at 4 d of age and this was associated with fused villus. Betaine inclusion reduces ($P<0.05$) width of the villus, increase ($P<0.05$) villus size and absorptive area and reduced ($P<0.05$) the number of enterocytes with positive reaction for the antibody Ki-67. Betaine inclusion reduced the severity of inflammatory response and increase the absorptive area and villus height of the duodenum of birds up to 14 d of age.

Keywords: Betaine; Fibre; Intestinal Adaptation; Liver; Pancreas

3.2 INTRODUCTION

At hatch, the gastrointestinal tract of broilers is not completely developed (UNI et al., 2003) and it affects the ability of the animal to digest and absorb nutrients (MORAN Jr, 2007). There are dramatic changes in the first few days of age in physiological characteristics such as expression of membrane transporters, endogenous enzyme activities and cell differentiation and physical characteristics such as villus and crypts development and the size

of the digestive tract (GEYRA et al., 2001; UNI et al., 2001). Changes in these parameters reaches a plateau between 7 and 10 days of age depending on the parameter observed, when the bird is considered to have a mature digestive tract for feed digestion and nutrient absorption (GEYRA et al., 2001; MORAN JR, 2007).

During the first days after hatch, broilers need to adapt the digestive tract from a diet based on fat and high digestible protein from the yolk to a more complex diet based on complex carbohydrates, less digestible and available protein and mineral sources and non digestible components such as fibre (MORAN JR, 2007). This change in substrate as a result of diet introduction, coupled with the insufficient ability to digest and absorb nutrients as the digestive tract is not yet adapted, means that nutrient digestibility is lower in young animals (LEITE et al., 2011). This results in an increased concentration of indigestible nutrients in the lumen of the digestive tract and elevates osmotic pressure which may lead to flow of water from the digestive tract epithelium to the lumen (KETTUNEN et al., 2001a), thus creating osmotic diarrhea. High osmotic solution can lead to inflammatory responses (HUBERT et al., 2004; SCHWARTZ et al., 2009) and apoptosis of enterocytes (ALFIERI et al., 2002), affecting nutrient digestibility and animal performance.

During the first week post hatch the digestive tract increases its weight disproportionally to other organs and tissues of the body (MAIORKA et al., 2003). Early development and adaptation of the digestive tract is also important for the subsequent development of other tissues and organs (MORAN JR, 2007) such as the immune system (DIBNER et al., 1998) and muscle (HALEVY et al., 2000) which can be restricted in their own development due to lack of nutrient supply.

Studies of fibrous ingredients and its impact on gut development and bird performance have shown variable results. Inclusion of fibrous ingredients stimulates gut development and villus growth (ADIBMORADI et al., 2016) and consequently increases the absorptive area of the gastrointestinal tract but also reduces energy and nutrient digestibility of broilers by dilution (ANNISON & CHOCT, 1991). Fibre inclusion modulates lower gut fermentation and affects the microbiota profile (REZAEI et al., 2011), but soluble fibre can also increase gut viscosity and passage rate of digesta in the small intestine (ADEOLA et al., 2016). The most common non-starch polysaccharide in cereals is arabinoxylans (KNUDSEN, 2014). The composition of this can be calculated by the sum of arabinose and xylose component in the cereal ingredients used in formulation (RAKHA et al., 2012). In leguminous ingredients such as soybean meal the most prominent non-starch polysaccharide is xyloglucan (KNUDSEN, 2014).

Natural betaine is a feed additive derived from sugar beet. Betaine is used in poultry nutrition both to reduce methionine and choline requirement as a methyl donor and as an osmoprotectant to reduce performance losses in stressful situations, such as heat and hyperosmotic stress (RATRIYANTO et al., 2009; EKLUND, et al., 2005). Betaine accumulates in the intestines, liver and kidney of broilers, serving as a methyl donor for adenosyl cysteine directly or by further demethylation in the mitochondria where it also forms glycine (CRAIG, 2004). Betaine accumulation is stimulated in cells suffering hyperosmotic stress independent of the presence of the betaine in the feed, suggesting that its accumulation is a natural defence of the organism (KETTUNEN et al., 2001b). Betaine is known as a chemical chaperone (SCHWAHN et al., 2003), reducing protein denaturation and maintaining protein and endogenous enzyme activity during heat and hyperosmotic situations (GONNELLI & STRAMBINI, 2001).

Betaine has been shown to improve water transit through the enterocyte, stimulate villus growth of broilers and reduce the effect of a coccidial challenge (KETTUNEN et al., 2001b). It also reduces enterocyte apoptosis (ALFIERI et al., 2002) and improves inflammatory responses such as the phagocytosis activity of macrophages and nitogen oxide release (KLASING et al., 2002). The data are equivocal however, as no effect was observed when betaine was fed in conjunction with a coccidial challenge (MATTHEWS & SOUTHEM, 2000) and performance results have also shown inconsistent results with reports showing improvement in animal performance or lack of improvement (ROSTAGNO & PACK, 1996).

The objective of this trial was to evaluate the effect of the increase concentration of insoluble non-starch polysaccharides levels, using rice bran as source of arabinoxylans, and betaine inclusion in the development and adaptation of the mucosa of duodenum and intestine, liver and pancreas development of broilers between hatch and 14 days of age.

3.3 MATERIALS AND METHODS

3.3.1 Birds and experimental design

The trial design was evaluated and approved by the Animal Use Ethics Committee of the Agricultural Science Campus of the Universidade Federal do Paraná (Protocol number 002/2015). Two hundred and fifty day-old male Cobb 500 broilers were sourced specifically for the experiment and housed in 16 stainless steel cages with 15 birds/cage. A further ten birds were included for determination of starting parameters. Room temperature was controlled with electric heaters to meet recommendations for different ages (COBB-VANTRESS INC., 2015). Cage dimensions were 0.90 m × 0.40 m, with 0.30m height. Birds

had access to water and feed *ad libitum*. Treatments consisted of a 2 × 4 factorial arrangement with 2 feed formulations with different levels of fibre concentration (low and high) and 4 inclusion rates of betaine (0; 1; 3 and 5 kg betaine/tonne of feed).

3.3.2 Diets and experimental products

Corn, soybean meal and rice bran were analyzed for moisture, protein, fibre, non-starch polysaccharides composition (CHOCT, 2015), minerals, fat and betaine content prior to formulation (Tabela 3.1). Arabinoxylans were calculated based on the concentration of arabinose and xylose levels in corn and rice bran (RAKHA et al., 2012) and non-starch polysaccharides concentration was calculated by the total sugar's residue in corn, soybean meal and rice bran. Mash diets (Tabela 3.2) were formulated according to requirements for broilers (ROSTAGNO, 2011). Betaine (Vistabet® 96, AB Vista – Marlborough, United Kingdom) was included at the appropriated rate to each treatment by replacing the relevant weight of washed sand. Feed samples were collected prior to the beginning of the trial for moisture, protein, fibre, minerals, fat and betaine content to confirm the feed formulation (Tabela 3.3).

TABELA 3.1 – PROXIMATE ANALYSIS RESULTS, BETAINE AND NON STARCH POLYSACCHARIDES COMPOSITION OF CORN, SOYBEAN MEAL AND RICE BRAN USED IN FEED FORMULATION

Ingredients		Corn	Soybean Meal	Rice Bran
Moisture, g/kg		126.8	112.9	87.0
Crude Protein, g/kg		82.0	460.1	127.7
Ether Extract, g/kg		32.9	19.1	225.3
Ash, g/kg		8.7	55.1	95.6
Crude fibre, g/kg		15.7	56.4	183.6
Calcium, g/kg		0.3	2.9	1.5
Phosphorus, g/kg		2.5	6.4	18.1
Betaine, g/kg		LD ¹	LD ¹	LD ¹
Non starch polysaccharides composition				
Rhamnose, g/kg	Soluble	LD ²	1.0	LD ²
	Insoluble	LD ²	1.0	LD ²
Fucose, g/kg	Soluble	LD ²	LD ²	LD ²
	Insoluble	LD ²	2.0	LD ²
Arabinose, g/kg	Soluble	1.0	6.0	2.0
	Insoluble	14.0	19.0	33.0
Xylose, g/kg	Soluble	LD ²	1.0	LD ²
	Insoluble	22.0	13.0	40.0
Mannose, g/kg	Soluble	2.0	5.0	LD ²
	Insoluble	3.0	5.0	3.0
Galactose, g/kg	Soluble	1.0	11.0	2.0
	Insoluble	5.0	32.0	9.0
Glucose, g/kg	Soluble	6.0	1.0	2.0
	Insoluble	25.0	46.0	61.0
Glucuronic acid, g/kg	Soluble	LD ²	LD ²	LD ²
	Insoluble	LD ²	LD ²	LD ²
Galacturonic acid, g/kg	Soluble	2.0	10.0	2.0
	Insoluble	2.0	16.0	2.0
Arabinoxylanes ³ , g/kg	Soluble	1.0	ND ⁴	2.0
	Insoluble	36.0	ND ⁴	73.0
Non Starch polisaccharides, g/kg	Soluble	12.0	35.0	8.0
	Insoluble	71.0	134.0	148.0

¹LD: Below limit of detection (0.07g/kg)

²LD: Below limit of detection (1g/kg)

³Calculated as reported by Rakha et al., 2012

⁴Not determined as arabinoxylanses are not present in soybenmeal.

TABELA 3.2 – DIET FORMULATION¹

Item	Low fibre diet	High fibre diet
Ingredient		
Corn (8%CP ¹), g/kg	533.60	463.80
Rice bran (12.5%CP), g/kg	-	70.00
Soybean oil, g/kg	35.00	43.50
Soybean meal (46%CP), g/kg	385.00	376.50
Limestone, g/kg	10.60	10.90
Dicalcium phosphate, g/kg	18.00	17.50
Salt, g/kg	4.60	4.60
Vitamin/Mineral premix ³ , g/kg	2.00	2.00
Lysine HCl, g/kg	2.05	2.05
DL Methionine, g/kg	3.25	3.25
L- Threonine, g/kg	0.65	0.70
Washed sand	5.00	5.00
Choline Chloride	0.25	0.20
Calculated nutritional value		
Crude protein, g/kg	220.00	220.00
Metabolizable energy, kcal/kg	3000	3000
Crude fibre, g/kg	29.50	43.50
Sol. Arabinoxylane, g/kg	0.53	0.60
Insol. Arabinoxylanse, g/kg	19.21	21.81
Sol NSP ⁴ , g/kg	19.88	19.30
Insol NSP, g/kg	89.48	93.74
Ether extract, g/kg	60.00	77.00
Ash, g/kg	34.00	39.00
Calcium, g/kg	9.50	9.50
Phosphorous, g/kg	6.80	7.60
Available Phosphorous, g/kg	4.50	4.50
Sodium, g/kg	2.00	2.00
Digestible Lysine, g/kg	12.50	12.50
Digestible Methionine + Cysteine, g/kg	9.10	9.10
Digestible Threonine, g/kg	8.10	8.10

¹Betaine included at the expense of inert.

²Crude Protein

³Supplied per kilogram diet: iron (Ferrous Sulphate), 60 mg, manganese (Manganese Sulphate and Manganese Oxide), 120 mg; zinc (Zinc Oxide), 100 mg; iodine (Calcium Iodate), 1 mg; copper (Copper Sulphate), 8 mg; selenium (Sodium Selenite), 0.3 mg, vitamin A, 9,600 IU; vitamin D₃ 3,600 IU; vitamin E, 18 mg; vitamin B₁₂, 15 mcg; riboflavin, 10 mg; niacin, 48 mg; d-pantothenic acid, 18 mg; vitamin K, 2 mg; folic acid, 1.2 mg; vitamin B₆, 4 mg; thiamine, 3 mg; d-biotin, 72 mcg.

⁴ Non starch polysaccharides

TABELA 3.3 PROXIMATE ANALYSIS AND BETAINES CONTENT ANALYZED IN FEED SAMPLES

Treatment		Low Fibre				High Fibre			
Betaine inclusion (kg/tonne)		0	1	3	5	0	1	3	5
Moisture, g/kg	Exp	115.0	115.0	115.0	115.0	105.0	105.0	105.0	105.0
	Anali	112.9	112.1	117.1	114.9	105.1	104.6	107.5	110.8
	Exp	220.0	220.0	220.0	220.0	220.0	220.0	220.0	220.0
Crude protein, g/kg	Anali	222.1	222.2	219.7	220.8	218.2	220.0	218.2	224.9
Ether extract, g/kg	Exp	60.0	60.0	60.0	60.0	77.0	77.0	77.0	77.0
	Anali	59.1	58.0	60.3	60.5	80.8	77.3	82.3	78.2
Crude fibre, g/kg	Exp	29.5	29.5	29.5	29.5	43.5	43.5	43.5	43.5
	Anali	47.9	50.3	44.4	45.2	61.5	51.9	54.6	59.7
Calcium, g/kg	Exp	9.5	9.5	9.5	9.5	9.5	9.5	9.5	9.5
	Anali	9.0	8.8	9.0	8.4	9.0	8.6	9.2	9.0
Phosphorus, g/kg	Exp	6.8	6.8	6.8	6.8	7.6	7.6	7.6	7.6
	Anali	6.6	6.6	6.7	7.1	7.7	7.4	7.2	7.6
Betaine, g/kg	Exp	0.0	1.0	3.0	5.0	0.0	1.0	3.0	5.0
	Anali	LD ¹	1.2	3.0	5.1	LD ¹	1.3	3.1	5.2

¹LD: Below limit of detection (0.07g/kg)

3.3.3 Animal performance

Body weight gain was determined at 4, 9 and 14 d of age and feed intake were determined at 14 d of age when feed conversion was calculated. Mortality was monitored daily and any dead or culled bird was weight at the same day and weight included for the calculation of feed conversion.

3.3.4 Sample collection and morphometry

At hatch, ten birds that were not assigned to a treatment were separated for initial sampling. Birds were weighted and euthanized by cervical dislocation. The intestine was collected from the cardiac junction to the cloaca. Intestine, liver and pancreas were weighted and the proportion of its weight calculated against the live weight of the bird. Intestine length was also measured. After weighting and measuring the intestine, two duodenum sample from each bird were taken from within 2 cm immediately anterior of the pancreatic duct for microscopy analysis. At 4, 9 and 14 d, ten birds per treatment were separated and the same collection process was followed for the determination of organs morphometry and 5 intestine in each treatment selected for duodenum collection.

3.3.5 Villus height, villus width, crypt depth and superficie area

The villus high and crypt depth was determined using 10 birds at hatch and 5 birds per treatment at 4, 9 and 14 d (IJI et al., 2001). Duodenum samples were washed with saline solution to remove any debris from the intestinal lumen sample and fixed with Bouin's solution. After 24 h samples were washed and dehydrated with etilic alcohol. The samples were set into paraffin blocks and 5 micrometers sections were cut. Samples were coloured with hematoxiline and eosine solution. Images were captured at 40x magnification and analysed using an image analysis system (Image J). Average 40 villi/sample was analysed, villus height was determined from the base to the top of the villi, villi weight was determined as the distance between both sides of the villi at the intermediate part of the villi and crypt depth determined from the base of the villi until the base of the crypt (Figura 3.1). Proportion of villus height and crypt depth was calculated based on the average of each sample. Absorption surface area was calculated as reported by (KISIELINSKI et al., 2002): Absorption area: $((WV \times HV) + (WV/2 + WC/2)^2 - (WV/2)^2) / ((WV/2 + WC/2)^2)$., where: WV is the width of the villus, HV is the height of the villus and WC is the width of the crypt

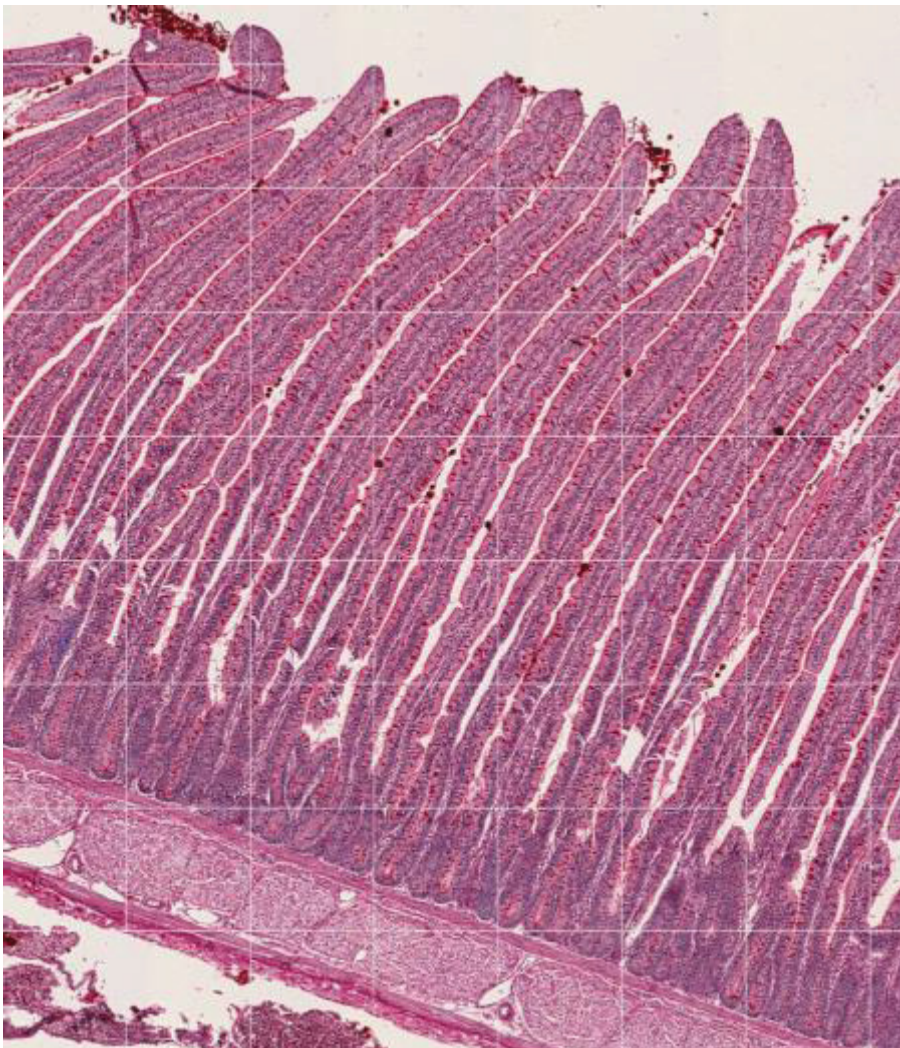


FIGURA 3.1 – VILLUS HEIGHT (VH) AND CRYPT DEPTH (CP) OF BROILERS WITH 14 DAYS OF AGE

3.3.6 Proportion of fused villus

Fused villus are representative of inflammatory response (TEIRLYNCK et al., 2009; GHOLAMIANDEHKORDI et al., 2007). Classification of fused villus as with characteristics of an inflammatory response was made on the same 40 villus/sample used for the determination of villus height, weight and crypt depth. Determination of fused villus was done visually and reported as a proportion of all villus evaluated for each sample (Figura 3.2 and Figura 3.3).

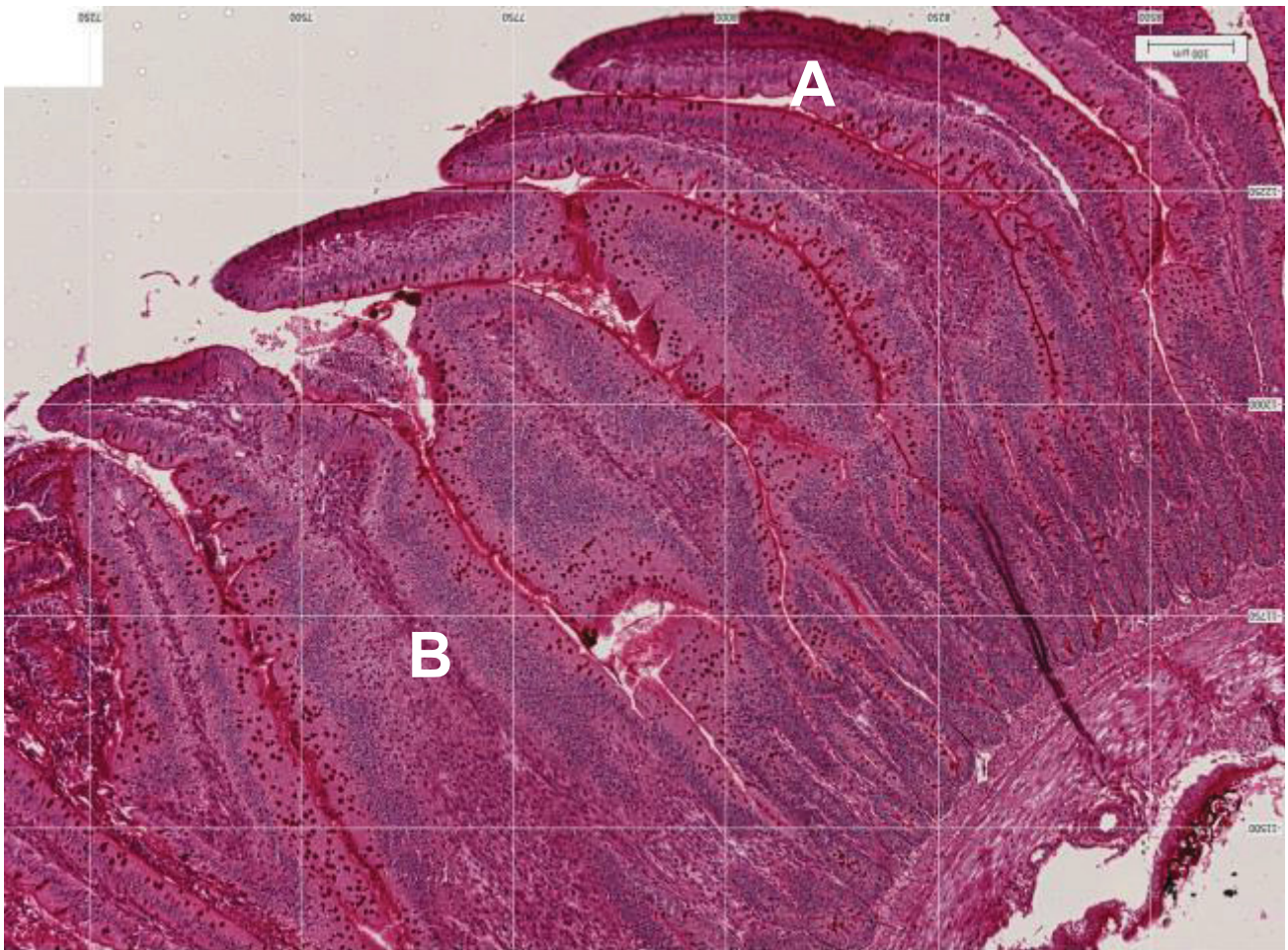


FIGURA 3.2 – VILLUS OF BROILERS WITH 4 DAYS OF AGE. A) REPRESENTS A REGULAR VILLUS WHILE B) REPRESENTS A VILLUS CLASSIFIED AS FUSED

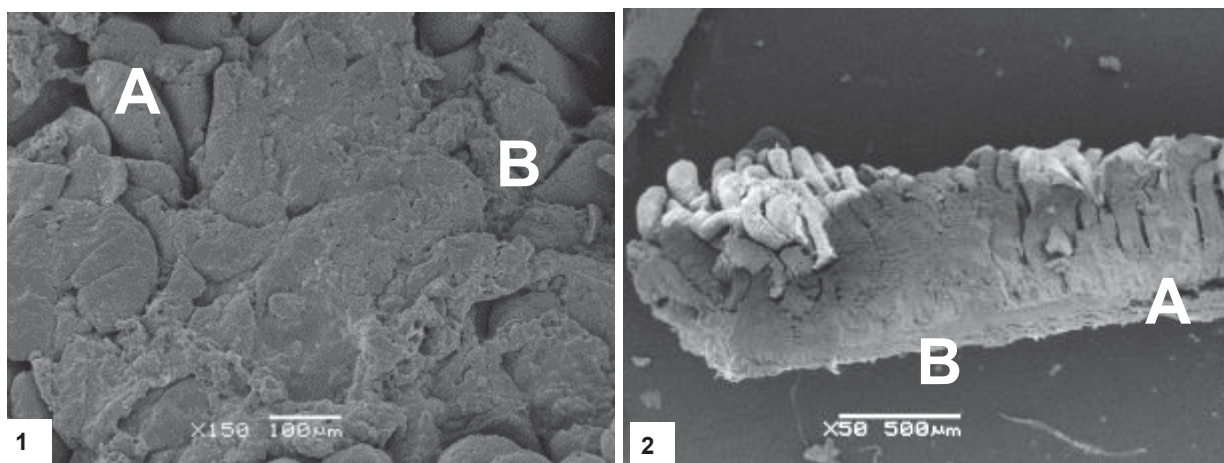


FIGURA 3.3 – VILLUS OF BROILERS WITH 4 DAYS (1) AND 9 DAYS (2) OF AGE. A) REPRESENTS A REGULAR VILLUS WHILE B) REPRESENTS A VILLUS CLASSIFIED AS FUSED.

3.3.7 Number of cells in mitosis

The number of cells was determined using 10 birds at hatch and 5 birds per treatment at 4, 9 and 14 d. Antibody Ki-67 was used as a reference of cells under replication (BOLOGNA-MOLINA et al., 2013). Duodenum samples were washed with saline solution to remove any debris from the intestinal lumen sample and fixed with Bouin's solution. After 24 h samples were washed and dehydrated with etilic alcohol. The samples were set into paraffin blocks and 5 µm sections were cut. After deparaffinization and rehydration, the tissue section were treated with 0.1M sodium citrate and Tween 20 to unravel the epitopes. Endogenous peroxidases were blocked with 0.9% hydrogen peroxide followed by incubation with 1% BSA to eliminate non-specific bindings. Monoclonal antibodies against Ki-67 (clone MIB-1:100 dilution, Dako, Carpinteria, CA, USA) were incubated with the tissue sections for 45 min. After that period sections were incubated with a biotinylated antibody and peroxidase complex for 30 min each. Images were captured at 40x magnification and analysed using an image analysis system (Image J). Average 30 villi/sample was analysed by the determination of a 200 µm area in the central part of the villi. Positive reaction was determined by the colour of the nucleus of the cell (Figura 3.4). All analysis were performed as blind samples by the same trained operator to avoid personal bias.

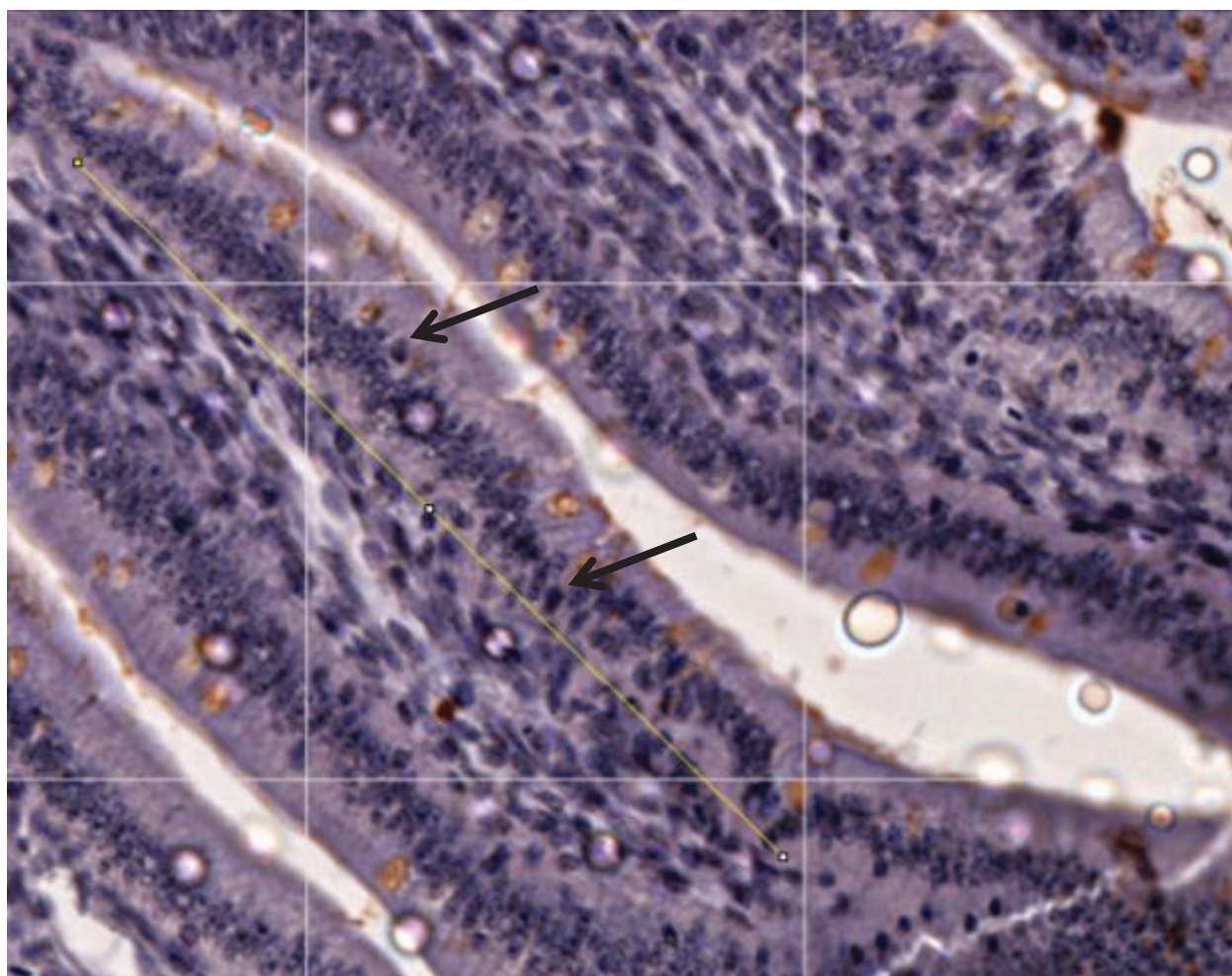


FIGURA 3.4 – VILLUS OF BROILERS AT 4 DAYS OF AGE. THE YELLOW LINE REPRESENTS A 200 MICROMETER DISTANCE. CELL WITH POSITIVE REACTION FOR KI-67 ANTIBODY ARE REPRESENTED BY DARK NUCLEOUS AS INDICATED BY BLACK ARROWS.

3.3.8 Scanning electron microscopy

Duodenum samples were taken from 3 birds at hatch and 3 birds per treatment at 4 and 9 d (MAIORKA et al., 2010; SANTOS et al., 2000). Samples were collected, intestinal content gently removed with a saline solution and immediately fixed in modified Karnovsky's fixative for 2 hours, washed with 0.1 M cacodylic acid buffer (pH 7.3), postfixed in 1% SO_4 in 0.1 M cacodylic acid buffer (pH 7.3) for one hour, dehydrated in increasing ethanol series, and dried with liquid carbon dioxide. Every duodenum sample was fractioned in 4 different sub-samples that were analysed individually in at least 6 different points in a total of 24 evaluations per sample. Scanning electron microscopy was performed using VEGA3 LMU (Tescan, Kohoutovice, Czech Republic) at 15 kV. Samples were mounted on aluminum

stubs with double face tape and coated with layer of gold (SCD 030; Pfeiffer, Balzers, Liechtenstein).

The big volume of samples evaluated was done so the structures reported were consistent on different areas of different animals and correlated with findings from staining microscopy.

3.3.9 Statistical analysis

Data were subjected to least squares ANOVA for a completely randomized design procedure of JMP Pro v.13 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Data was analysed in a three-way interaction considering age, non-starch polysaccharide content of the diet and betaine inclusion. Each animal served as the experimental unit. When the effects were found to be significant, treatment means were separated using Tukey's Significant Difference test. Statistical significance was accepted at $P < 0.05$.

3.4 RESULTS

Moisture, crude protein, ether extract, calcium, phosphorus and betaine concentration in the feed samples were close to expected levels (Tabela 3.3). Fibre concentration was higher than expected in both diets. The difference in crude fibre content between the low and high fibre diets was kept constant between treatments however, which maintained the expected difference in fibre concentration between low and high fibre diets. Differences observed may be partially explained by the presence of washed sand in the formulation as this will not solubilize during the fibre analysis assay and be account as fibre in the final of the process, and the assayability as considering the expected fibrous concentration a 20% variation in analysis is acceptable (FAO, 2011).

During the whole period of the trial only one bird died and no birds were culled from any treatment. Mean broiler weights were 47, 121, 260 and 456 grams at hatch, 4, 9 and 14 days respectively, close to the expected weight of the genetic line (COBB-VANTRESS INC., 2015). Betaine inclusion and fibre concentration did not affect body weight gain and feed conversion at 14 d of age ($P > 0.05$). Animals fed diets with high fibre concentration had higher ($P = 0.028$) feed intake ($564 \pm 19\text{g}$) than those fed diets with low fibre concentration ($490 \pm 19\text{g}$).

3.4.1 Intestine, liver, pancreas and yolk sac morphometry

The proportion of the yolk sac, intestine, liver and pancreas as a function of the live body weight of broilers changed between hatch and 14 d of age (Tabela 3.4). At hatch,

yolk sac represented more than 14% of the weight of the broiler but this value reduced ($P<0.05$) dramatically at 4 d of age and reduced further ($P<0.05$) at 14 d of age. Intestinal weight as a proportion of body weight was greatest ($P<0.001$) at 4 d of age and reduced thereafter. The weight of the pancreas was below the limit of detection of the scale at hatch, indicating that its relative weight was less than 0.1% (0.05g) of the bird's weight at that age. Pancreas relative weight increased ($P<0.05$) at 4 and 9 d of age. Birds fed the high fibre diet had a lighter ($P<0.05$) pancreas, as a proportion of body weight, compared with animals fed low fibre diet. Liver weight reduced ($P<0.05$), proportionally to the body weight of the bird, after 4 d of age. Fibre concentration in the feed and betaine inclusion did not affect yolk sac and liver proportions, nor the length or relative weight of the intestine ($P>0.05$).

TABELA 3.4 – INTESTINAL LENGTH (CM) AND RELATIVE WEIGHT (% BODY WEIGHT) OF YOLK SAC, INTESTINE, LIVER AND PANCREAS OF BROILERS AT HATCH, 4, 9 AND 14 DAYS OF AGE FED LOW AND HIGH FIBRE DIET INCLUDED WITH 0, 1, 3 OR 5 KG OF BETAINE/TONNE OF FEED¹

Treatment	Intestine Length (cm)	Intestine Weight (%BW)	Yolksac (%BW)	Liver (%BW)	Pancreas (%BW)
Age (days)					
Hatch	44.4 ^d	5.95 ^d	14.40 ^a	4.62 ^a	ND ⁴
4	93.1 ^c	14.27 ^a	0.31 ^b	4.65 ^a	0.46 ^b
9	112.4 ^b	11.90 ^b	0.08 ^{bc}	3.88 ^b	0.51 ^a
14	132.9 ^a	10.77 ^a	0.06 ^c	3.32 ^c	0.49 ^{ab}
SEM ¹	1.01	0.147	0.065	0.063	0.013
Fibre					
Low ²	112.0	12.19	0.10	3.99	0.51 ^a
High ³	113.0	12.44	0.20	3.91	0.47 ^b
SEM	0.82	0.120	0.047	0.053	0.010
Betaine (kg/tonne)					
0	113.5	12.40	0.24	3.92	0.49
1	111.0	12.46	0.12	3.85	0.50
3	112.6	12.27	0.15	4.01	0.48
5	112.5	12.16	0.09	4.03	0.47
SEM	1.16	0.169	0.067	0.074	0.015
p-value					
Age	<0.001	<0.001	0.005	<0.001	0.010
Fibre	0.590	0.143	0.128	0.356	0.017
Betaine	0.465	0.595	0.450	0.304	0.414

Fibre × Betaine	0.349	0.495	0.734	0.254	0.317
Fibre × Age	0.352	0.123	0.785	0.914	0.924
Betaine × Age	0.649	0.167	0.911	0.320	0.053
Fibre × Betaine × Age	0.551	0.148	0.599	0.705	0.683

^{a,b} Mean within columns with different superscripts are different ($P < 0.05$).

¹ Means and standard error of the mean represent 10 birds.

² Corn-soybean meal diet

³ Corn-rice bran-soybean meal diet

⁴ Below Limit of detection

3.4.2 Villus morphometry, crypt dept and absorption area of duodenum

Villus morphometry was affected by the age of the bird, content of fibre in the diet and betaine inclusion in the diet (Tabela 3.5). Diets with the higher fibre concentration and inclusion of 5 kg/tonne of betaine increased villus height ($P < 0.05$) but no effect was observed of both on crypt depth or villus/crypt ratio. Villus width was greater ($P < 0.05$) in animals at 4 and 9 d of age compared with birds at 0 and 14 d of age and the width was reduced ($P < 0.05$) by the inclusion of 3 or 5 kg/tonne of betaine in the diet. No difference in the absorptive area of the intestine was observed between animals of 0 and 4 d of age but area increased in animals at 9 and 14 d of age ($P < 0.05$). Inclusion of 5 kg/tonne of betaine increased ($P < 0.05$) the absorptive area of the duodenum of broilers, compared to the non-supplemented control.

TABELA 3.5 – VILLUS HEIGHT AND WIDTH (UM), CRYPT DEPTH (UM), VILLUS/CRYPT RATION AND ABSORPTIVE AREA (UM²) OF THE DUODENUM OF BROILERS AT HATCH, 4, 9 AND 14 DAYS OF AGE FED LOW AND HIGH FIBRE DIET INCLUDED WITH 0, 1, 3 OR 5 KG OF BETAINE/TONNE OF FEED¹

Treatment	Villus		Crypt depth (um)	Villus/crypt ratio	Absorptive area (um ²)
	Height (um)	Width (um)			
Age (days)					
Hatch	421 ^d	84 ^b	74 ^c	5.75 ^{bc}	17.0 ^c
4	857 ^c	170 ^a	165 ^b	5.27 ^c	15.6 ^c
9	1159 ^b	129 ^a	172 ^{ab}	6.81 ^b	26.67 ^b
14	1365 ^a	110 ^b	180 ^a	7.81 ^a	36.9 ^a
SEM ¹	19.0	3.7	3.8	0.186	1.17
Fibre					
Low ²	1096 ^b	128	173	6.44	25.5
High ³	1153 ^a	124	172	6.79	27.3
SEM	15.7	3.0	3.2	0.155	1.12
Betaine (kg/tonne)					
0	1080 ^b	136 ^a	166	6.59	24.8 ^b

1	1131 ^{ab}	130 ^{ab}	179	6.42	25.0 ^{ab}
3	1121 ^{ab}	120 ^b	177	6.39	25.7 ^{ab}
5	1174 ^a	120 ^b	167	7.12	30.0 ^a
SEM	22.2	4.2	4.5	0.218	1.37
p-value					
Age	<0.001	<0.001	0.035	<0.001	<0.001
Fibre	0.022	0.359	0.799	0.149	0.205
Betaine	0.037	0.019	0.133	0.081	0.027
Fibre × Betaine	0.854	0.551	0.737	0.696	0.764
Fibre × Age	0.736	0.997	0.776	0.816	0.802
Betaine × Age	0.866	0.697	0.278	0.567	0.568
Fibre × Betaine × Age	0.729	0.215	0.988	0.782	0.951

^{a,b} Mean within columns with different superscripts are different ($P < 0.05$).

¹ Means and standard error of the mean represent 10 birds at hatch and 5 birds at 4, 9 and 14 d of age.

² Corn-soybean meal diet

³ Corn-rice bran-soybean meal diet

3.4.3 Fused villus and cells in mitosis

Fused villus and the presence of enterocytes in the villus with positive reaction to antibody Ki-67 are reported in Tabela 3.6. The proportion of fused villus in the duodenum increased ($P < 0.05$) from hatch to 4 d of age, reducing afterwards, with no effect of betaine or fibre concentration. Inclusion of 1 or 3 kg/tonne of betaine reduced ($P < 0.05$) the number of enterocytes with positive reaction for the antibody Ki-67 at the centre portion of the villus, compared to the non-supplemented control. While, the inclusion of 5 kg/tonne further reduced ($P < 0.05$) the number of enterocytes with positive reaction. Birds at 14 d of age had lower ($P < 0.05$) number of enterocytes with positive reaction to the antibody Ki-67 on the villus compared with birds of younger age and fewer ($P < 0.05$) were noted at 9 d compared with birds at 4 d of age. Fibre concentration had no influence on the number of enterocytes with positive reaction to the antibody Ki-67.

TABELA 3.6 – PROPORTION OF FUSED VILLUS (%) AND NUMBER OF ENTEROCYTES CELLS WITH POSITIVE REACTION FOR KI-67 ANTIBODY (CELLS/200UM) IN THE CENTER OF THE VILLUS IN THE DUODENUM OF BROILERS¹

Treatment	Proportion of fused villus (%)	Positive Ki-67 reaction (cells/200 um ³)
Age (days)		
Hatch	0.0 ^c	4.79 ^{ab}
4	19.1 ^a	5.91 ^a
9	10.3 ^b	3.98 ^b

14	1.7 ^c	2.78 ^c
SEM ¹	1.30	0.188
Fibre		
Low ²	10.5	4.21
High ³	10.5	4.11
SEM	0.105	0.105
Betaine (kg/tonne)		
0	12.6	5.32 ^a
1	10.6	4.22 ^b
3	9.0	3.86 ^b
5	9.7	3.16 ^c
SEM	1.57	0.150
p-value		
Age	< 0.001	< 0.001
Fibre	0.917	0.353
Betaine	0.352	<0.001
Fibre × Betaine	0.287	0.564
Fibre × Age	0.619	0.487
Betaine × Age	0.856	0.180
Fibre × Betaine × Age	0.579	0.266

^{a,b} Mean within columns with different superscripts are different ($P < 0.05$).

¹ Means and standard error of the mean represent 10 birds at hatch and 5 birds at 4, 9 and 14 d of age.

² Corn-soybean meal diet

³ Corn-rice bran-soybean meal diet

3.5 DISCUSSION

The primary objective of the present trial was to evaluate the development of the gastrointestinal tract of broilers in the initial days after hatch. Performance effects were not the main scope of the trial but the results may help to support the other physiological effects observed. The reduced number of replicates when considering the performance effect should be considered with caution considering the small number of replicates even when the interaction is not significant and the number of replicates is higher.

At hatch the gastrointestinal tract is not totally developed and several transformations take place once the bird starts to eat a complex diet based on carbohydrates and proteins (GEYRA et al., 2001). In the present trial, both electron and stained microscopy were used to evaluate the development and adaptation of broiler chicken duodenum enterocytes between hatch and 14 d of age (Figura 3.5 and 3.6). At hatch, enterocytes present a small structure with small villus; however dramatic morphological changes occur up to 14 d when the structure looks similar to what would be expected for a duodenum villus.

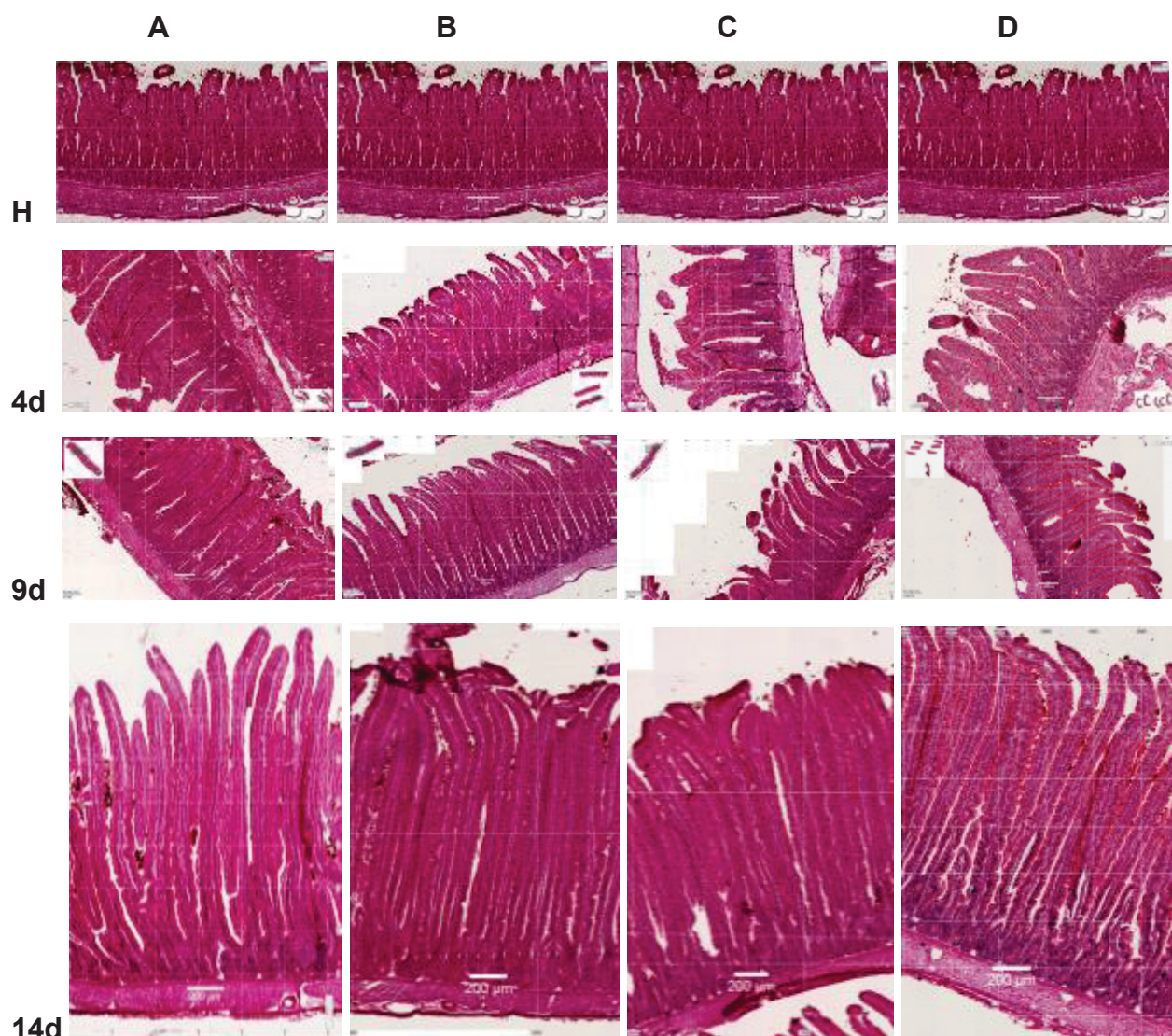


FIGURA 3.5 – DUODENUM SAMPLES, EVALUATED BY STAINING MICROSCOPY, OF BROILERS FED LOW FIBRE DIETS WITH 0 (A) OR 5 (B) KG OF BETAINE/TONNE OR HIGH FIBRE DIET WITH 0 (C) OR 5 (D) KG OF BETAINE/TONNE AT HATCH (H), 4, 9 AND 14 DAYS OF AGE. FIGURES FOR HATCH ARE THE SAME FOR ALL TREATMENTS. WHITE BARS IN THE CENTRE BOTTOM OF EACH FIGURE REPRESENTS 200UM.

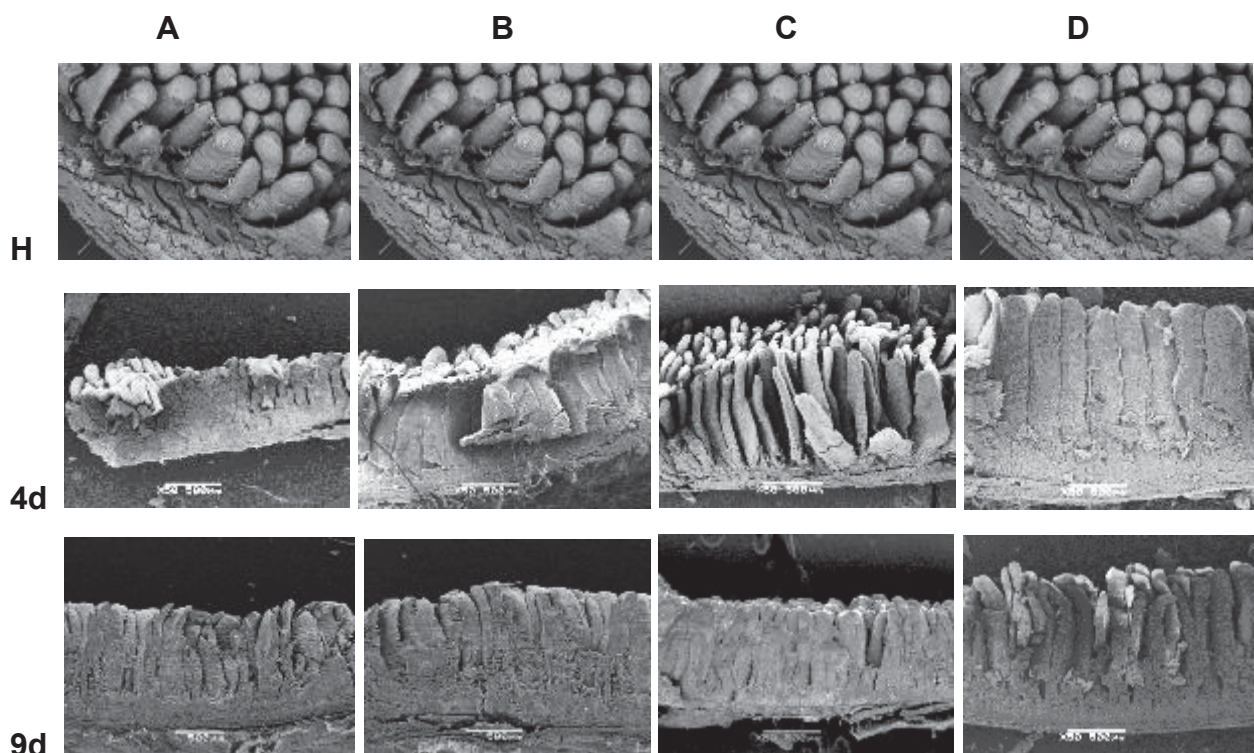


FIGURA 3.6 – DUODENUM SAMPLES, EVALUATED BY SCANNING ELECTRON MICROSCOPY, OF BROILERS FED LOW FIBRE DIET WITH 0 (A) OR 5 (B) KG OF BETAINE/TONNE OR HIGH FIBRE DIET WITH 0 (C) OR 5 (D) KG OF BETAINE/TONNE AT HATCH (H), 4, 9 AND 14 DAYS OF AGE. FIGURES FOR HATCH ARE THE SAME FOR ALL TREATMENTS.

As early as 4 d of age, almost all of the contents of the yolk sac has disappeared and at the same time that the size and weight of the intestine increases. The length of the intestine more than doubled between hatch and 4 d of age while its relative weight increased almost 3 times during these initial 4 d. Increased pancreas and maintained liver size as a proportion of live body weight confirms the degree and rate of specialization of the gastrointestinal tract taking place in order to improve nutrient digestibility and absorption. At 9 d post hatch, the relative size of the pancreas continues to grow while the proportionate size of the liver and intestine reduces. The relative growth of the intestine and pancreas plateau at approximately 8 d of age (LILBURN & LOEFFLER, 2015), which supports the findings of the present trial.

Birds fed diets with high fibre concentration had lower relative pancreatic weights. Previous trials have shown that a larger particle size may stimulate gizzard development and pancreas size (SVIHUS et al., 2004), so it is possible that the small particle size of rice bran in the present trial, as a substitution from ground corn, played a role reducing the relative

weight of the pancreas. High dietary fibre content reduces the speed of starch absorption and thus may also reduce the stimulus for insulin and glucagon secretion (HOODA et al., 2010), thus possibly affecting pancreas size.

The duodenum was chosen as a reference section for evaluation of gut development and adaptation in the present trial. Although it is understood that assessment of gut development differs in specific regions of the small intestine, the duodenum presents a higher correlation between RNA expression, RNA/DNA, RNA/protein and Protein/DNA with age and faster and more intense development of the villus when compared to jejunum and ileum (UNI et al., 1998). Birds fed high fibre diets had higher villus compared to birds fed diets with a low fibre concentration. Results in the literature are inconsistent regarding the effect of fibre on villus development, an increase in the villus height:crypt depth ratio of broilers when insoluble fibre was included in diets (REZAEI et al., 2011) but this effect depends of the type of fibre included (RAHMATNEJAD & SAKI, 2016).

Part of this inconsistency may be related to the definition of the product tested in each trial. The effect of fibre increasing villus:crypt ratio was observed by (REZAEI et al., 2011) when an insoluble fibre was fed while the effect observed by (RAHMATNEJAD & SAKI, 2016) was related to the presence of a soluble fibre source. In the present trial rice bran was used as the fibre source, which is principally an insoluble source of fibre. Thus it seems plausible that the effect of fibre stimulating villus growth is related to insoluble sources of fibre. Fibre reduces the metabolisable energy of the diet due to a dilution effect (ANNISON & CHOCT, 1991) and the increase in the villus height in the duodenum may be related to an attempt by the animal to increase nutrient absorption. In the present trial, birds fed high levels of fibre also increased feed intake but did not increase body weight gain, which suggests the fibre was a diluent in this trial even though the feeds were formulated to be isoenergetic. Also, higher vilus structure may have affected the mainentence of the intestinal tissue, reducing energy and nutrient used for animal growth. An increase in the villus height in young animals may support better performance in the long term due to an increased ability of the bird to increase nutrient digestion and absorption but on other hand it also represents more energy and nutrients being allocated to a non-productive tissue if further improvement in performance is not observed. Besides that, as one objectives of the present trial was to evaluate the impact of a high fibre diet in a practical formulation, rice bran was chosen as high fibre ingredient. It's important to stress, though, that besides a high fibre content, rice bran also has other characteristics such as a high phytate and silica concentration and fat highly degradable, all factors that may also have impacted and interfered with the broilers performance.

As birds age, the gastrointestinal tract adapts and becomes more specialized for nutrient absorption. An increase in crypt depth and villus height in the duodenum is observed as broilers age, resulting in an increased ratio between villus and crypt. The absorptive area, though, does not increase between hatch and 4 d of age as the increase in villus height is also associated with a big increase in the width and presence of fused villus, so the height advantage is offset by fewer villi per a similar area (Figura 3.2 and Figura 3.3).

The presence of fused villus with hypertrophic layer of enterocytes in the present trial between 4 and 9 d of age is a characteristics similar to the one observed during inflammatory responses caused by a coccidial challenge in birds between 18 and 25 d of age (GHOLAMIANDEHKORDI et al., 2007). Higher proportion of fused villus in broilers fed a wheat/rye based diet compared to broilers fed a corn based diet (TEIRLYNCH et al., 2009). However, this effect was reduced by the inclusion of zinc bacitracin, suggesting that the high viscosity caused by the soluble fibre present in wheat and rye may be causing a bacterial growth and an inflammatory response. It is unlikely that in the present trial the birds were suffering from a coccidial challenge as they were raised in cages with no access to their faeces, fused villus were observed when birds were too young to be suffering a coccidial challenge, coccidia oocysts were not observed in any lamina and no macroscopic symptom were observed. The inflammatory response observed in this trial could be related to the lumen content of the gastrointestinal tract creating a local inflammatory response either directly or through creation of a hyperosmotic solution due to the lack of nutrient absorption.

Betaine inclusion reduced the width of the villus and increased its length, and consequently increased the absorptive area of the duodenum, although the proportion of villus with inflammatory characteristics was not affected. Betaine acts as an osmoprotectant, reduces inflammatory responses (KLASING et al., 2002) and apoptosis in enterocytes in hyperosmotic solution (ALFIERI et al., 2002), and increases villus height and water flow in enterocytes (KETTUNEN et al., 2001a). It is possible that the presence of betaine helps the intestine to cope with the high osmotic pressure created by the presence of unabsorbed nutrients in the lumen, reducing the inflammatory response and helping the intestine to develop and adapt.

The number of enterocytes in mitosis on the villus, determined by the positive reaction to the antibody Ki-67, reduced as the broilers aged, thereby signaling cell differentiation and adaptation of the villus (WILLING & VAN KESSEL, 2009). Previous trials have already observed that, in contrast to mammals, birds usually maintain a certain number of enterocytes undergoing mitosis at the center of the villus (UNI et al., 1998). The proportion of enterocytes with a positive reaction, signifying the process of mitosis, in the present trial was

lower than previously observed by other authors when a cyclin antibody (PCNA) was used (UNI et al., 1998; GEYRA et al., 2001). Although, a similar trend of a reduction in the concentration as birds age has been observed. This difference may be related to the antibody used to determine cells in mitosis, as previously research using PCNA antibody gave higher readings than that determined by Ki67 used in the present trial (BOLOGNA-MOLINA et al., 2013). Antigen Ki-67 is a nuclear protein expressed in proliferating cells with maximum expression in G2 phase and during mitosis (SOBECKI et al., 2016). PCNA, also known as cyclin is a protein that functions as a cofactor for DNA polymerase and increases rapidly in mid-G1, remaining elevated throughout the S-phase and decreases from G2 to G1 phase of the cell cycle (UNI et al., 1998).

The number of enterocytes with positive reaction to the antibody Ki-67 on the villus did not change between hatch and 4 d, but reduced afterwards at 9 and 14 d. This effect may be related to the adaptation process and the stimulus due to the inflammatory and protective response observed by the number of fused villus observed at young ages. Betaine inclusion reduced the number of enterocytes with positive reaction at the villus and suggests that the inclusion of betaine may help the animal to overcome the challenge and speed up recovery after an inflammatory response and maintain organ function during this process.

3.6 CONCLUSION

Gut development and adaptation is a key factor for animal performance during the pre-starter and starter phase. During the first 14 d of age, the size of the digestive tract of broilers increased disproportionately compared with other organs. Transitory inflammatory responses during this period was observed and was reduced by the presence of betaine in the diet, suggesting that this damage may be related to a high concentration of non-absorbed nutrients in the lumen of the digestive tract. Betaine inclusion reduced the severity of this inflammatory response and so supported an improvement in the absorptive area and villus height of the duodenum of birds up to 14 d of age. The higher fibre diet increased feed intake and villus height but did not affect body weight gain and reduced pancreas relative weight, possible due to a dilution effect of the fibre reducing nutrient absorption and consequently stimulating villus growth to improve absorption rates.

4 INFLUENCE OF FIBRE AND BETAINE ON MUCUS PRODUCTION AND DIGESTA AND PLASMA OSMOLALITY OF BROILERS FROM HATCH TO 14 DAYS OF AGE

4.1 ABSTRACT

An experiment was designed to determine the influence of fibre and betaine on mucus production and blood and digesta osmolality of broilers from hatch to 14 days of age. A total of 250 day old Cobb 500 male broilers were allocated to 16 cages with 15 broilers each. Treatments were arranged in a 2 x 4 factorial design, with 2 replicate cages per treatment. Treatments consisted of two feed formulations (low and high fibre diets (rice bran)) and 4 levels of betaine (0, 1, 3 or 5 kg/tonne). At hatch, 10 broilers that were not allocated to the cages were euthanized by cervical dislocation and had blood and duodenum samples collected. On days 4, 9 and 14, 5 birds/cage (10 birds/treatment) were selected and euthanized by cervical dislocation for blood, duodenum and digesta collection. Mucus production was assessed by the determination of sialic acid content of digesta samples and caliciform cell count in the duodenum. Osmolality in both digesta and plasma samples was also determined. Sialic acid secretion reduced with bird age while caliciform cell count was reduced at 14 d compared with 4 and 9 d. Inclusion of 5 kg/tonne betaine in corn/soy diets reduced sialic acid secretion while caliciform cell count was reduced by the inclusion of rice bran or betaine at 5 kg/tonne. Osmolality of the digesta was higher at 4 d compared with 9 d and 14 d ($P<0.05$) while inclusion of 1 kg/tonne of betaine reduced digesta osmolality independent of age ($P<0.05$). Plasma osmolality was also greater at 4 d ($P<0.05$) but no effect of fibre or betaine was observed. Overall, mucus production was elevated at 4 d which may be correlated with the higher osmolality in both digesta and plasma at this age. Inclusion of an osmoprotectant such as betaine may reduce these effects due to a reduction in the osmolality of the digesta which would consequently reduce stimulation of caliciform cell differentiation and mucus production.

Keywords: Caliciform cell, duodenum, osmotic potential, sialic acid

4.2 INTRODUCTION

Since the end of the last century increasing pressure has been placed on animal production due to restriction in the use of antibiotics as growth promotants in animal nutrition, specifically in broiler production. This process began in Europe and has gradually extended to other regions such as North and South America and Asia. As a result, alternatives to

antibiotics, such as enzymes (BEDFORD & COWIESON, 2011), acidifiers (FERNANDEZ-RUBIO et al., 2009), plant extracts (HASHEMIPOUR et al., 2013), pre and probiotics (ASHRAF et al., 2013) have been researched. In addition, the contribution of factors such as the quality of ingredients, management, health status and gut integrity have received greater attention as the use of antibiotics becomes more and more limited.

Intestinal integrity is determined by factors such as villus structure, microbiota profile, and the expression of specific genes related to proteins such as “GAP” junction, mucus production and interleukines (CHEN et al., 2015). The gut is responsible for nutrient absorption but represents one of the first challenges to bird development. At hatch, the gut is not completely developed and not able to efficiently digest and absorb the nutrients present in the feed. Endogenous enzyme production, membrane transporters, villus and crypt formation and cell differentiation are only fully developed between 7 and 10 days of age (UNI et al., 1998; UNI et al., 1999; UNI et al., 2000 and GEYRA et al., 2001). As a result, digestion and nutrient absorption are not fully developed for the first days of life. Digestibility of energy and protein is therefore lower in young animals as a consequence of this incomplete development. This is an increasingly important consideration as the growth rate of the modern broiler increases with the result that the starter phase represents a greater proportion of the total lifespan.

The presence of indigestible and non-absorbed nutrients in the intestine increases osmotic pressure, moving water into the lumen. They may also be used as substrate for microbial growth. Coccidial challenge is known to reduce nutrient absorption, affecting body weight gain and increasing osmolarity in the duodenum and jejunum of broilers but colonisation was reduced by betaine inclusion in the diet (KLASING et al., 2002). Non starch polysaccharides (NSP) are key components of broiler diets as they are present in significant quantities in the cell walls of cereals. However, they are not utilized by the animal and remain undigested and unabsorbed and may have a role in reducing nutrient digestibility and absorption, thus increasing intestinal nutrient content and hence performance (CHOCT et al., 1996).

Mucus, produced by caliciform cells in the intestinal villus, is one of the protective barriers against pathogenic and environmental challenges. Mucus production can be assessed by the determination of sialic acid concentration present in the digesta. Sialic acid is a nine-carbon carboxylated sugar molecule involved in the structure of complex carbohydrates including glycoproteins, glycolipids and keratin sulphate proteoglycan (NAKANO et al., 1994). The presence of a high concentration of sialic acid in the digesta is related to cell death, bacterial and pathological conditions and osmotic fragility

(VAJRESWARI & NARAYANAREDDY, 1992). As a result the concentration of sialic acid can be used as an indicator of mucin production in the gastrointestinal tract of rats (LARSEN et al., 1993), and is associated with lower mineral and amino acid retention in broilers (COWIESON et al., 2004).

Inclusion of fibrous ingredients in diets offered when refeeding starved rats has been shown to stimulate villus growth and enteroglucagon secretion (GOODLAND et al., 1987), promote gizzard growth and modulate the intestinal microbiota in broilers in the early stages of growth, supporting improved performance later in life (REZAEI, et al., 2011). However, inclusion of significant quantities of fibrous ingredients have also been related to reduced nutrient digestibility and performance (KRAS et al., 2013). Part of this effect may be related to high phytate concentration in high fibre ingredients such as rice bran (LIU et al., 2008).

The characteristics of the fibre may also interfere with the consistency of the responses to its inclusion in diets. KRAS et al. (2013) observed reduced nutrient digestibility in high fibre diets formulated with wheat bran and oat hulls, while the use of micronized insoluble fibre improved performance in broilers (REZAEI et al., 2011). Villus growth and enteroglucagon secretion were correlated with the presence of readily fermentable fibre in the lower intestine of rats, but not with the content of non-fermentable fibre such as wood cellulose or Kaolin (GOODLAND et al., 1987). The most common system for classifying fibre is neutral and acid detergent fibre but this system fails to account for most soluble non-starch polysaccharides, which makes this method of classification less relevant in monogastric nutrition. Fibre evaluation based on its nutritional property, solubility and type of sugar would be more relevant (CHOCT, 2015).

Betaine is a methylated compound, originating from sugar beet production which has osmoprotectant characteristics. Betaine is routinely used in broiler production as a substitute for other methyl donor compounds such as methionine and choline (RATRIYANTO et al., 2009). Betaine inclusion in broiler feed has been shown to reduce drip loss in meat, support intestinal growth (EKLUND et al., 2005) and reduces inflammatory responses that result from a coccidial challenge (KLASING et al., 2002). However, the effect noted are not unequivocal as some researchers have not obtained positive results in performance (ROSTAGNO & PACK, 1996) or protection against coccidial challenge (MATTHEWS & SOUTHERN, 2000).

The objective of this trial was to evaluate the effect of rice bran and betaine inclusion in the gut and plasma osmolality, sialic acid secretion and calciform cells number in duodenum of broilers between hatch and 14 days of age.

4.3 MATERIALS AND METHODS

4.3.1 Sample collection

Experimental design and diets followed the same protocol described in Chapter 3.

At hatch, ten birds that were not assigned to a treatment were separated for initial sampling. Blood samples were collected into heparinized tubes by cardiac puncture and stored for analysis later. After blood collection, birds were euthanized by cervical dislocation. The intestine was collected and a duodenum sample was taken from 2 cm immediately anterior of the pancreatic duct. At 4, 9 and 14 d, ten birds per treatment were separated and the same collection process was followed. After collection of the duodenum, digesta was manually collected from the ileum and frozen at -20° C for further processing.

4.3.2 Plasma and digesta osmolality

Plasma and digesta osmolality were determined from all 10 birds at hatch and from 5 birds per treatment at days 4, 9 and 14 which were selected from the 10 sampled. Plasma and digesta samples were collected from the same broilers selected for the determination of the number of caliciform cells.

Blood samples were centrifuged at 1500 rpm for 5 minutes and plasma collected and immediately frozen at -20°C until further analysis. Prior to analysis, undiluted samples were warmed to room temperature before osmolality analysis was performed using a vapor pressure micro-osmometer (Wescor VAPRO, Logan) as described by FOSTER et al. (2010).

Digesta samples were warmed to room temperature and centrifuged at 10000 rpm for 5 minutes and the supernatant separated and immediately re-frozen at -20° C. When analysis was performed, the supernatant samples were warmed to room temperature and osmolality determined in samples using a vapor pressure micro-osmometer (Wescor VAPRO, Logan) as described by FOSTER et al. (2010).

4.3.3 Sialic acid secretion

Sialic acid secretion was determined from 5 samples per treatment at 4, 9 and 14 d. Digesta samples were freeze dried at -50° C at 0.030 mmHg pressure for 12 hours using a Terroni – Model LS3000 equipment. A subsample of the freeze dried sample was dried at 105° C for moisture and dry matter determination. An aliquot of the remaining freeze dried sample was used for determination of sialic acid secretion as described by JOURDAIN et al. (1971). Samples were diluted with methyl-2-propanol and digested with Periodic Acid. After

cooling to room temperature, resorcinol was added and the sample cooled. Samples were centrifuged for 5 minutes at 1500 rpm and read in a spectrophotometer at 630 nm and compared against a sialic acid concentration standard curve.

4.3.4 Number of caliciform cells

The number of caliciform cells was determined from all 10 birds at hatch and 5 birds per treatment at 4, 9 and 14 d as described by ROCHA et al. (2014). Duodenal samples were washed with saline solution to remove any debris and fixed with Bouin's solution. After 24 h, samples were washed and dehydrated with etilic alcohol. The samples were set into paraffin blocks and 5 micrometer sections were taken using a microtome. Samples were stained with hematoxiline and eosine solution. Images were captured at 40 x magnification and analysed using an image analysis system (Image J). An average of 30 villi/sample were analysed by the viewing a 200 micrometer area from the central part of the villae. The number of caliciform cells was recorded considering their colour, presence of mucus and nucleus position as described in Figura 4.1. All analysis were performed blind by the same trained operator to avoid personal bias.

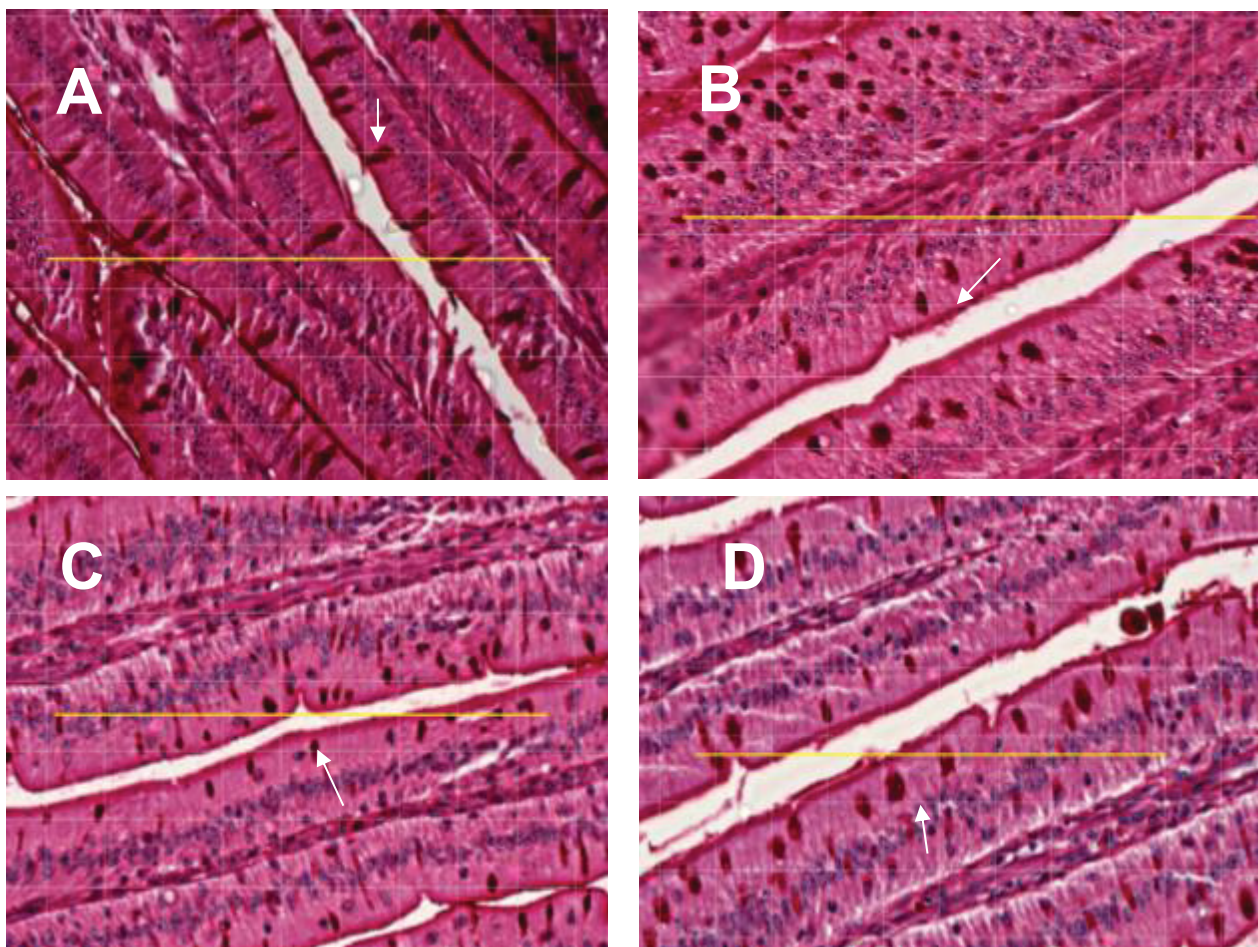


FIGURA 4.1 – VILLUS OF BROILERS AT HATCH (A), 4 (B), 9 (C) AND 14 (D) DAYS OF AGE. THE YELLOW LINE REPRESENTS A 200 MICROMETERS DISTANCE. CALICIFORM CELLS REPRESENTED BY DARK CELLS AS INDICATED BY WHITE ARROWS.

4.3.5 Statistical analysis

Plasma and digesta osmolality, sialic acid secretion and the number of caliciform cells data were subjected to ANOVA using the GLM models for completely randomized design procedure of Minitab (Minitab Ltd, Version 16. Coventry, UK). Data were analysed in a using age, fibre content of the diet and betaine inclusion as factors along with all interactions. Each animal served as the experimental unit. When the effects were found to be significant, treatment means were separated using Tukey's Significant Difference test. Statistical significance was accepted at $P < 0.05$. Linear and quadratic regression were calculated for betaine inclusion and age. Pearson correlation between all parameters was performed considering individual values for each bird.

4.4 RESULTS

4.4.1 Plasma and digesta osmolality

Dietary fibre concentration had no effect on plasma osmolality ($P = 0.119$). On the low fibre diet the mean (\pm SEM) osmolality was 336 ± 3.7 mosmol/kg compared with 343 ± 3.6 mosmol/kg for the high fibre diet. Plasma osmolality was (\pm SEM) higher at d 4 (353 ± 3.9 mosmol/kg) compared ($P < 0.001$) with birds at hatch (333 ± 4.6 mosmol/kg) and at 9 d (327 ± 1.8 mosmol/kg). Digesta osmolality was higher ($P < 0.001$) at 4 d with mean (\pm SEM) 481 ± 6.4 mosmol/kg compared with 9 d (453 ± 8.8 mosmol/kg) and 14 d (433 ± 5.4 mosmol/kg). Inclusion of 1 kg/tonne of betaine reduced ($P = 0.036$) digesta osmolality (437 ± 7.6 mosmol/kg) compared to 0 kg/tonne (467 ± 10.8 mosmol/kg) and 5 kg/tonne (466 ± 7.5 mosmol/kg) but no difference was observed compared to the inclusion of betaine at 3 kg/tonne (454 ± 8.2 mosmol/kg). Dietary fibre concentration had no effect on digesta osmolality ($P = 0.767$).

4.4.2 Caliciform cells count

The number of caliciform cells in each villus was influenced by the age of the bird, betaine inclusion and diet type (Tabela 4.1) there being fewer at 14 d compared to days 4 and 9 of age ($P < 0.05$). A quadratic regression suggested caliciform cell count maximized between 4 and 9 days of age ($P < 0.05$; $r^2 = 0.127$). Betaine inclusion linearly reduced the

number of caliciform cells ($P < 0.05$; $r^2 = 0.037$). The number of cells in animals receiving 5 kg/tonne betaine was lower than those not receiving betaine in their diets ($P < 0.05$). The number of caliciform cells in the villus ($P < 0.05$) fell with increased dietary fibre.

TABELA 4.1 MEAN (STANDARD ERROR OF THE MEAN)¹ CALICIFORM CELLS COUNT (NUMBER OF CALICIFORM CELLS/200 MICROMETERS) OF DUODENUM SAMPLES AND SIALIC ACID SECRETION (MG/KG DRY MATTER) OF BROILERS AT HATCH, 4, 9 AND 14 DAYS OF AGE FED LOW AND HIGH FIBRE DIET INCLUDED WITH 0, 1, 3 OR 5 KG OF BETAINE/TONNE OF FEED

Age	Fibre	Betaine	Caliciform cell (cells/200 micrometers)	Sialic acid (mg/kg DM)
Hatch			12.1 ^{ab} (1.1)	-
4			13.6 ^a (0.3)	4390 ^a (159)
9			13.6 ^a (0.5)	3180 ^b (88)
14			11.7 ^b (0.2)	2720 ^c (141)
	Fibre			
	Low ²		13.6 ^a (0.4)	3400 (135)
	High ³		12.4 ^b (0.2)	3460 (148)
		Betaine		
		0	13.9 ^a (0.7)	3450 (206)
		1	12.6 ^{ab} (0.3)	3420 (186)
		3	13.3 ^{ab} (0.4)	3520 (201)
		5	12.2 ^b (0.3)	3390 (212)
<i>P</i> -value				
Age			0.002	0.001
Fibre			0.008	0.693
Betaine			0.001	0.855
Age x Fibre			0.550	0.124
Age x Betaine			0.397	0.875
Fibre x Betaine			0.100	0.022
Age x Fibre x Betaine			0.241	0.486

^{a,b} Mean within columns with different superscripts are different ($P < 0.05$).

¹ Means and standard error of the mean represent 10 birds at hatch and 5 birds per treatment at 4, 9 and 14 days of age.

² Corn-soybean meal diet

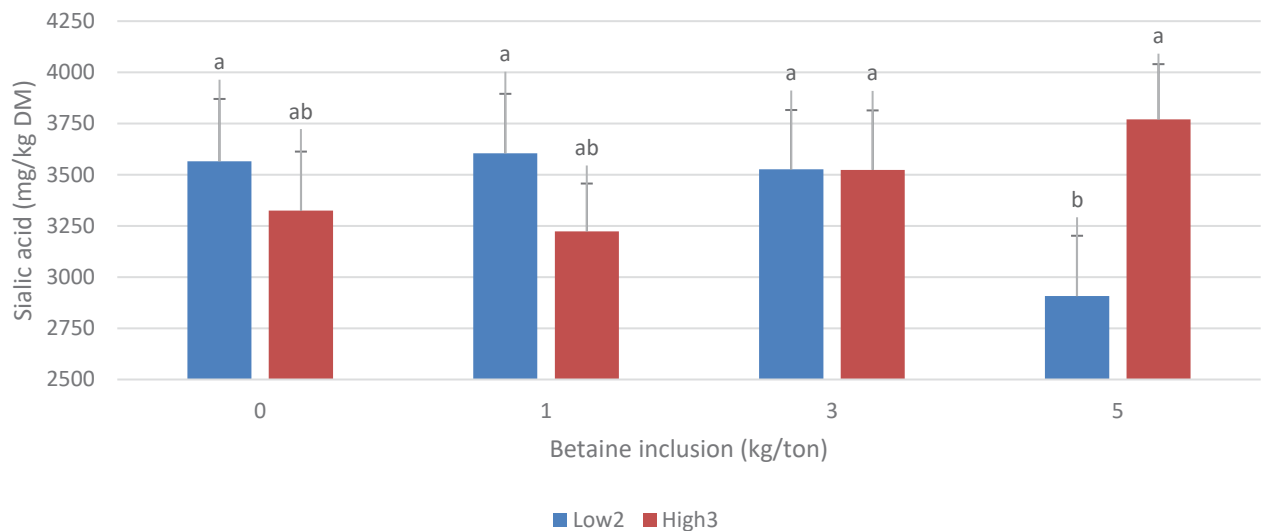
³ Corn-rice bran-soybean meal diet

4.4.3 Sialic acid secretion

Sialic acid secretion gradually reduced from 4 to 14 days of age ($P < 0.05$), (Tabela 4.1). Inclusion of 5 kg/tonne of betaine reduced sialic acid secretion when broilers were fed the low fibre (corn/soybean meal) diet ($P < 0.05$) but a similar effect was not observed

when the high fibre (corn/soybean meal/rice bran) diet was fed (Figura 4.2). Sialic acid secretion correlated positively with caliciform cell count, plasma and blood osmolality (Tabela 4.2).

FIGURA 4.2 – MEAN (STANDARD ERROR OF THE MEAN) ¹ OF THE INTERACTION BETWEEN FIBRE CONTENT AND BETAININE INCLUSION ON THE SIALIC ACID SECRETION IN THE DIGESTA OF BROILERS BETWEEN 4 AND 14 DAYS OF AGE FED HIGH ² OR LOW³ FIBRE DIETS WITH DIFFERENT INCLUSIONS OF BETAININE



^{a,b} Mean within columns with different superscripts are different ($P < 0.05$).

¹ Means and standard error of the mean represent 5 birds per treatment at 4, 9 and 14 days of age.

² Corn-soybean meal diet

³ Corn-rice bran-soybean meal diet

TABELA 4.2 – PEARSON CORRELATION BETWEEN SIALIC ACID SECRETION (SAS), CALICIFORM CELL COUNT (CCC), PLASMA (PO) AND DIGESTA OSMOLALITY (DO) OF BROILERS BETWEEN HATCH AND 14 DAYS OF AGE FED LOW² AND HIGH ³ FIBRE DIET INCLUDED WITH 0, 1, 3 OR 5 KG OF BETAININE/TONNE OF FEED

Parameter		PO	CCC	DO
CCC	P value	0.437		
	Correlation	-0.123		
DO	P value	0.717	0.100	
	Correlation	0.062	0.216	
SAS	P value	0.001	0.023	0.006
	Correlation	0.466	0.306	0.337

¹ Correlation calculated based in individual results

² Corn-soybean meal diet

³ Corn-rice bran-soybean meal diet

4.5 DISCUSSION

Digesta osmolality was chosen as a key indicator of the quantity of soluble nutrients present in the digesta.

In the present trial, broiler plasma osmolality was higher in animals at 4 days of age compared to hatch and 9 (353 versus 333 and 327 mosoml/kg, respectively). These results are higher than previously reported. YAHAV et al. (1997) reported broiler serum osmolality ranged between 303 and 315 mosmol/kg in 28d old birds while ANDREWARTHA et al. (2011) reported plasma osmolality varied between 275 and 280 mosmol/kg in embryos between 13 and 17 days of incubation. Presence of an anticoagulant for the collection tubes affects blood osmolality (GARCIA et al., 2014) and may partially explain the higher values obtained in the present trial and by YAHAV et al. (1997) while difference with those of ANDREWARTHA et al., (2011) could also be related to age.

Osmolality reflects the concentration of soluble organic and inorganic components with low molecular weight. Plasma osmolality is maintained at a constant level mainly by regulation of the concentration of minerals such as sodium, potassium, chloride and soluble proteins. The higher osmolality observed in the plasma of 4 day old broilers in the present trial is thus likely related to the concentration of these plasma components. Digesta osmolality of broilers at 4 d was higher than at 9 and 14 days, and suggests that the ability of the GIT to digest and absorb nutrients at this early age is reduced.

At hatch, the gastrointestinal tract (GIT) of the broiler is not fully adapted and the development of the enterocytes is not completed, resulting in limited enzyme production and low levels of membrane transporters (UNI et al., 2003). The early days post-hatch represent a transition phase for the digestive tract, from dealing with absorbing highly available fats and amino acids derived from the yolk, to receiving nutrients contained in diets based on more complex proteins and carbohydrates. As a consequence, nutrient digestibility is not optimised during this stage which possibly affects animal development and influences the quantity and identity of components in the GIT. Adaptation of the GIT completes between 7 and 14 days, depending on the criteria used to describe the end of this adaptation process (UNI et al., 1998; UNI et al., 1999; UNI et al., 2000 and GEYRA et al., 2001).

This process of adaptation becomes increasingly important with genetic and management improvements which have reduced the time taken for broilers to achieve market weight. As a consequence, the early period of development comprises a larger proportion of the total production cycle. Thus, an improvement in the rate of adaptation of the gastrointestinal tract during this initial phase will play a larger and larger role in the overall

performance of broilers with genetic advancement (SILVA et al., 2004; DOS SANTOS et al., 2010).

Digesta osmolality at 14 d was close to that observed at 21 d as previously reported (MAGWEDERE & MUKARATIRWA, 2008). Independent of age, inclusion of 1 kg/tonne of betaine reduced gut osmolality to a value similar to that observed by MAGWEDERE & MUKARATIRWA (2008). However, the higher betaine inclusion rates didn't continue in this vein and osmolality increased with further inclusion rates. This may be related to a saturation in betaine absorption and, consequently, higher betaine concentrations in the lumen of the digestive tract with increasing dietary inclusion, resulting in higher osmolality. Although increased fibre concentration reduces free water content in the GIT (CELI et al., 2017; TAKAHASHI, 2011), no effect of fibre concentration in digesta osmolality was observed.

Enterocytes in the GIT are exposed to a hyperosmotic environment at the apical portion with physiological osmolality at the basolateral level. Cells in an hyperosmotic state undergo dehydration, reducing in volume and produce inflammatory cytokines which may lead to apoptosis (HUBERT et al., 2004). Presence of compatible osmolytes such as inositol, betaine and taurine have shown to reduce these effects (ALFIERI et al., 2002). Osmolytes are small organic molecules and inorganic ions produced or absorbed by cells for protein protection against adverse environmental conditions such as heat and osmotic stress. Organic osmolytes can be classified as polyols such as glycerol and sucrose, certain amino acids and amino acid derivatives such as taurine and alanine, urea and methylamines such as trimethylamine, betaine and sarcosine (YANCEY et al., 1982).

These organic osmolytes can be classified as compatible or counteracting depending on their effect on the functional activity of proteins (YANCEY et al., 1982). Compatible osmolytes such as proline, glycine and sucrose stabilize proteins without affecting their functional activity while counteracting osmolytes such as methylamines and betaine protect intracellular protein against inactivation by urea (GONNELLI & STRAMNI, 2001).

In the present trial it is observed that 4 d was the critical phase, when the osmotic pressure of the digesta was at its greatest such that it could be affecting enterocyte development. Similar osmotic pressures have shown to induce apoptosis in lung enterocytes (HUBERT et al., 2004) and lead to interleukin (IL) secretion by intestinal enterocytes in cell culture (ALFIERI et al., 2002). These findings suggest that the environment encountered in the current study for the 4d old broilers was probably encouraging an inflammatory response (SCHWARTZ et al., 2009).

Mucus production and the number of caliciform cells were also higher at 4 d. Sialic acid secretion was not yet determined at the beginning of the trial as birds had not received

feed but from 4 to 14 d, sialic acid secretion decreased. Caliciform cells showed a quadratic response, increasing in the period between 4 and 9 d and then reducing there afterwards. Correlations between sialic acid secretion and plasma and digesta osmolality and caliciform cell number supports such a hypothesis, whereby an increase in osmolality results in an increase number of caliciform cells which secrete more mucus as a protective response to the osmotic challenge. Caliciform cells specialize in mucus production and their number and rate of differentiation in the villus and the amount of mucus they produce (which is correlated with sialic acid content of the digesta) is stimulated by high digesta osmolality. Once the osmotic stimulus subsides, mucus production decreases, sialic acid secretion decreases and over a period of time the number of caliciform cells is reduced.

There was a linear decrease in caliciform cell number as the betaine inclusion rate increased. These results suggest a role for dietary betaine in reducing endogenous nutrient losses and inflammatory responses during the stressful time following hatch. KLASING et al. (2002) observed that broilers challenged with coccidia had increased digesta osmolality and IL1 and IL6 expression and betaine ameliorated the reduction of villi and increased the numbers of intraepithelial and lamina propria leukocytes. Taken together the current results and those of KLASING et al. (2002) suggest a role for dietary betaine in managing the changes in the intestinal environment and the concomitant modulating mucus production.

Fibre inclusion in broiler diets has shown to stimulate gut development and improve digestibility of nutrients, support growth of beneficial bacteria, and improve broiler performance and reduce faecal moisture (REZAEI et al., 2011). In other work, high fibre concentrations have been related to lower digestibility and performance (KRAS et al., 2013). These differences may be related to the type of fibre used in each trial and its specific response. In the present evaluation rice bran was chosen to increase the fibre content of the diet and the fibre characterization of the vegetable ingredients was performed as suggested by CHOCT (2015). Both corn and rice bran are composed mostly by insoluble fibre but the higher concentration in rice bran increases the insoluble fibre content in the feed (Tabelas 3.1 and 3.2).

The high fibre diet reduced the number of caliciform cells in the villus but had no effect in sialic acid secretion, plasma or digesta osmolality. This may seem counterintuitive as caliciform cells are those that produce mucus and consequently increase sialic acid secretion. Previous trials have shown that a high fibre diet increases villus height (STEFF et al., 2011), but since the caliciform cells were determined in a certain portion of the villus in this study, it's possible that a stimulus to increase villus size may reduce the concentration of the caliciform cells in one specific villus portion.

4.6 CONCLUSION

Osmolality in plasma and digesta was maximized during the first 4 days post hatch. Sialic acid secretion and caliciform cell count increased at the same age, suggesting that these parameters are a response to the high osmolality present. Betaine inclusion reduced digesta osmolality and the number of caliciform cells and digest sialic acid content in the low fibre diet only. The inclusion of an osmoprotectant such as betaine may reduce these protective responses due to its ability to counteract the effect of the high osmolality of the digesta in the cell and consequently reduce the protectant stimulus for caliciform cell differentiation and mucus production. These effects may be limited and depend on others factors such as fibre content and type in the diet.

5 IMMUNE PROFILE OF BROILERS BETWEEN HATCH AND 9 DAYS OF AGE FED DIETS WITH DIFFERENT BETAINE AND FIBRE CONCENTRATIONS

5.1 ABSTRACT

An experiment was designed to determine the immune profile of broilers between hatch and 9 days of age when fed diets with different fibre and betaine concentrations. A total of 250 Cobb 500 male broilers were allocated to 16 cages with 15 broilers each. Treatments were arranged in a 2 x 4 factorial design, with 2 replicate cages per treatment. Treatments consisted of two feed formulations (low and high fibre diets (rice bran)) and 4 levels of betaine (0, 1, 3 or 5 kg/tonne). At hatch, 10 broilers were weighed and a blood sample collected by cardiac puncture, then euthanized by cervical dislocation and a jejunal sample collected for the determination of gene expression of Claudin 1, Claudin 5, Occludin and Interleukin 2 by PCR. Leukocyte populations in the blood was determined by flow cytometry. On days 4, and 9, 5 birds/cage (10 birds/treatment) were selected, euthanized and treated as birds at hatch. Gene expression of Claudin 1, Claudin 5 and Occludin reduced ($P < 0.001$) between 4 and 9 days while Interleukin tended ($P < 0.06$) to increase between hatch and 4 d and fell ($P < 0.0001$) thereafter. Betaine inclusion reduced ($P < 0.001$) Claudin 5 and Occludin gene expression and increased ($P < 0.0001$) CD8- CD28+ and CD8+ CD28+ suggesting it may aid in accelerating adaptation of the gastrointestinal tract and modulation of the immune system for broilers in the early days post hatch.

5.2 INTRODUCTION

Immunocompetence is the ability of the body to produce a normal immune response following exposure to an antigen. Constant genetic selection for improved weight gain and feed conversion has reduced the immunocompetence of broilers and as a result increased disease susceptibility (BRIDLE et al., 2006). Control of the immune response of broilers is an essential part of broiler production because generation of an immune response when not required represents a significant expense of energy and nutrients that could have been targeted to more productive processes such as increased body weight gain. Furthermore, failure to generate an immune response when it is necessary is even more detrimental due to the morbidity and mortality it may cause. The immune system not only responds to pathogenic challenges but also acts as a support for the nervous system, helping maintaining the homeostasis of the animal (TADA, 1997).

At hatch, broilers do not have a fully developed immune system (KOGUT, 2017). During the first few days post hatch, both cellular and humoral immune systems develop, including the development of the Bursa of Fabricius and the thymus where B and T lymphocytes mature (DIBNER et al., 1998). These organs increase proportionally with body weight at early ages and then recede as the animal gets older (CAZABAN et al., 2015).

Similar to the immune system, the gastrointestinal tract is not fully developed at hatch and undergoes significant development during the first days post hatch (UNI et al., 2003). The association in development of these two organs is linked not only as they are poorly developed at hatch but also because the development of the immune system depends on the availability of nutrients and energy that are obtained and absorbed via the gastrointestinal tract. Moreover the gut functions as a sensory organ for the development of the immune system (FURNESS et al., 2013). Impaired nutrient absorption can degrade the initial development of the immune system, compromising immunocompetence for the rest of the animal's life (DIBNER et al., 1998). At the same time, maintenance of the immune status in the gastrointestinal tract has a high maintenance cost for the animal (KOGUT et al., 2017).

At hatch, gastrointestinal enterocytes are not tightly linked to each other, allowing the passage of large molecules such as antibodies from yolk sac via paracellular routes directly into the interstitial spaces (KARCHER & APPELGATE, 2008). Relaxation of tight junctions and thus opening of paracellular passages is a route used by pathogenic bacteria and viruses while other bacteria actually increase rigidity of these junctions thereby reducing permeability (SOMMER & BACKHED, 2013). There are agglomerations of immune cells in the gastrointestinal tract called gut-associated lymphoid tissues which protect the body against the passage of microbiota from the gastrointestinal tract to other organs. These lymphoid tissues are not uniformly distributed in the gut but are more concentrated in the hindgut and especially the ceca where the microbiota population is highest (YEGANI & KORVER, 2008).

The gut microbiota is not completely developed at hatch and changes as soon as the animal starts to eat (BALLOU et al., 2016). The composition of the feed influences the immune status (OAKLEY & KOGUT, 2016) of the animal and the species of bacteria that can flourish. The diet also influences the osmolarity of the intestines, with hyperosmolality often stimulating inflammatory responses (SCHWARTZ et al., 2009).

Thus the composition of the feed can influence the immune status of broilers. Further considerations include fibre, where high fibre diets have been shown to increase the digesta transit time and stimulate bacteria growth due to a reduction in nutrient digestibility (ADEOLA et al., 2016). Such diets also increase gut fermentation and possibly increase the

inflammatory status of the digestive tract (CELI et al., 2017). On the other hand, fibre fermentation in the lower gut stimulates butyrate production, a trophic substance that stimulates villus growth (RAHMATNEJAD & SAKI, 2016), increases “Gap” junction protein expression, reduces inflammatory responses and endogenous losses during a coccidial challenge (ADEDOKUN et al., 2012), reduces the presence of pathogenic bacteria in internal organs and improves animal performance (REZAEI et al., 2011)

Betaine is a by-product of sugar production and can also be produced synthetically as an HCl salt. Betaine is an osmoprotectant and is recognized as a chemical chaperone which prevents protein denaturation and thus maintains activity in hyperosmotic situations (SCHWAHN et al., 2003). Birds fed betaine have been shown to have reduced inflammatory responses when subsequently exposed to a coccidial challenge and maintain higher water flow and villus size (KETTUNEN et al., 2001) but similar effects were not observed when the betaine was offered at the same time as the coccidial challenge (MATTHEWS & SOUTHERN, 2000).

The objective of the present trial was to evaluate the proportion of circulating immune cells, and the “Gap” protein and Interleukin 2 gene expression in broilers at hatch, 4 and 9 days of age when fed diets with different levels of fibre and inclusion rates of betaine.

5.3 MATERIALS AND METHODS

5.3.1 Sample collection

Experimental design and diets followed the same protocol described in Chapter 3.

At hatch, ten birds that were not assigned to a treatment were separated for initial sampling and weight. Birds were weighed and blood collected by cardiac puncture. Birds were then euthanized by cervical dislocation. The intestine was collected from the cardiac junction to the cloaca. One jejunal sample defined as the section between the duodenal loop and 1cm distal of the Meckel’s diverticulum (TEIRLYNCK et al., 2009) was taken from each bird. At 4 and 9 d, ten birds per treatment were separated and the same collection process was followed for blood and jejunum collection.

5.3.2 Flow cytometry analysis

Aproximately 2 ml of blood were collected into a heparin treated vacutainer tube. Initially the number of mononuclear cells in the blood was determined using Histopaque-1077 (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) as described by FAIR et al. (2008). Blood samples were centrifuged at 400 x g for 30 minutes after dilution with phosphate-buffered saline (PBS) and

Histopaque-1077 and white cells then collected as the layer above the erythrocytes. They were then washed with PBS and centrifuged at 400 x g for 7 minutes. Samples were fixed with 1% paraformaldehyde and counted using a Neubauer counting chamber.

Once the cell concentration in the blood was determined, flow cytometry was performed as reported by STABEL et al. (2000). Briefly, 50 µl of blood (equivalent to 10⁶ mononuclear cells) was incubated for 30 minutes at 37 °C with specific antibodies and fixed in paraformaldehyde for 30 minutes at 4 °C. This process was repeated for the secondary antibody. Monoclonal antibodies to the specific subset of cells were supplied by Southern Biotechnology: “CD4” specificity for T helper lymphocytes; “CD8β” specificity for T cytotoxic lymphocytes; “CD28” specificity for memory T lymphocytes; “Mo” specificity for monocytes; “MHCII” specificity for antigen-presenting cells and “TCR αβ Vβ1” specificity for T lymphocytes.

Reading was performed within 2 h of staining on a FACScalibur flow cytometer (Beckman Dickinson) as reported by BEIRÃO et al. (2012). Green fluorescence was detected on the FL1 channel (530/30nm), and orange fluorescence was detected on the FL2 channel (585/42nm). Cells were analyzed at up to 10,000 events in the lymphocyte gate and data were analyzed with FlowJo software (TreeStar Inc).

5.3.3 Claudin, Occludin and Interleukin 2 gene expression

Jejunal samples were immediately put in dry ice after sampling and stored at -80 °C. A 5 mm² section of each sample was collected and processed as described by ADEDOKUN et al. (2012). RNA extraction was performed as per the manufacturer's protocol (RNeasy® RT Brochure, 2016, Molecular Research Center Inc., Cincinnati, OH). The RNA pellet was dissolved in nuclease-free water (OmniPure, EMD Chemicals Inc., Gibbstown, NJ) and its concentration determined using a 260/280 nm nanodrop spectrophotometer (Fisher Scientific, St. Louis, MO) and extracted RNA stored at -80 °C.

Primers were designed for real-time PCR with the Oligo Analyzer 3.1 tool from Integrated DNA Technologies for the cDNA sequence obtained from the NCBI database. Genes evaluated in this study were glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) which served as the house-keeping gene, Claudin 1 and 5, Occludin and Interleukin 2. A list of the primers used in the present study is reported in Tabela 5.1.

PCR analysis was performed as described by BUSTIN et al. (2009). Complementary DNA was synthesized from 1µg of total RNA using I Script Select cDNA Synthesis kit (BioRad) with Oligo (dT)₂₀ primer mix and GSP enhancer solution. The synthesis reaction was as follows: 25 °C for 5 minutes, 42 °C for 1 hour, and 70 °C for 15 minutes. The reaction for

PCR were carried out on a RotorGene Real Time PCR System (Quiagen Inc., Thousand Oaks, CA) in an EvaGreen fluorescent system. The following PCR conditions were used: 95 °C for 10 minutes, followed by 40 cycles of 60 °C for 10 seconds and 95 °C for 10 seconds. All samples were processed in triplicate and expressed relative to the house-keeping gene. For the analysis of gene expression at different ages, the expression was calculated based on the average expression of the target gene and housekeeping gene as reported by Pfaffi (2001) using the results from the low fibre diet without betaine inclusion as the reference.

TABELA 5.1 – PRIMERS USED FOR REAL-TIME PCR

Genes	Forward primer	Reverse primer	Fragment size (bp)
<i>GAPDH</i>	TCTGGAGAAACCAGCCAAGT	GAGACAACCTGGTCCTCTGTG	104
<i>CLDN1</i> ¹	CCAATGAAGAGGGCTGAT	GTGCATGGAGGATGACCA	185
<i>IL2</i> ²	TCCCAGGTAACACTGCAGAGTTT	TTGGAAAATATCAAGAACAAGATTCATC	92
<i>CLDN5</i> ³	ATCTGTGCGCCTTTGAGACT	GCGACCTGCAATGAGTTCCG	149
<i>OCLN</i> ⁴	GTGGGTTCTCATCGTCATC	GTTCTTCACCCACTCCTCC	156

¹ Claudin 1

² Interleucine 2

³ Claudin 5

⁴ Occludin

5.3.4 Statistical analysis

Data was log adjusted prior to analysis as described by BEIRÃO et al. (2012). Data were subjected to ANOVA using the GLM model for completely randomized design procedure of JMP Pro (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Treatment means at hatch, 4 and 9 d of age were separated by Tukey's Significant Difference test. Results at 4 and 9 days of age were also analysed using a two-way interaction considering fibre betaine inclusion levels for the gene expression data and inclusion of a third factor, age, to generate the three-way interaction considering for the Leukocyte population. A three-way interaction for gene expression was not considered as the samples were not collected from the same animals. Each animal served as the experimental unit. Statistical significance was accepted at $P < 0.05$.

5.4 RESULTS

5.4.1. Claudin, Occludin and Interleukin 2 gene expression

Gene expression for Claudin 1 and Claudin 5, Occludin and Interleukin 2 reduced ($P < 0.0001$) at 9 d compared to hatch and 4 d of age (Tabela 5.2). At 4 d of age, inclusion

of 1 and 3 kg/tonne of betaine reduced ($P < 0.05$) gene expression of Claudin 5 and Occludin while inclusion of 5 kg/tonne had intermediate results (Tabela 5.3). At 9 d of age, reduction was dependent on the fibre content in the diet as betaine inclusion reduced ($P < 0.0001$) Claudin 1 and 5, Occludin and Interleukin 2 gene expression in the low fibre diets but no effect was observed in high fibre diets. When betaine was not included in the diet, broilers fed the high fibre diets also presented lower ($P < 0.0001$) gene expression for Claudin 1 and 5, Occludin and Interleukin 2 (Tabela 5.3).

TABELA 5.2 – CLAUDIN 1, CLAUDIN 5, OCCLUDIN AND INTERLEUKIN 2 GENE EXPRESSION (LOG OF THE PROPORTION OF GADPH EXPRESSION) ON JEJUNAL SAMPLES OF BROILERS AT HATCH, 4 AND 9 DAYS OF AGE ¹

Treatment	Claudin 1	Claudin 5	Occludin	Interleukin 2
Age (days)				
Hatch	-0.055 ^a	-0.588 ^a	-0.176 ^a	-0.798 ^a
4	-0.374 ^a	-0.687 ^a	-0.469 ^a	-0.108 ^a
9	-2.828 ^b	-2.521 ^b	-2.143 ^b	-2.184 ^b
SEM	0.109	0.211	0.137	0.202
<i>P</i> -value	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

^{a,b} Mean within columns with different superscripts are different ($P < 0.05$).

¹ Means and standard error of the mean represent 10 birds at hatch, 4 and 9 d of age.

5.4.2. Leukocyte population in peripheral blood

Leukocyte populations varied depending on the age and inclusion of betaine, while fibre concentration had no effect. The population of CD8-CD28⁺ and CD8⁺CD28⁺ cells increased ($P < 0.0001$) from hatch to 4 d of age and fell thereafter while CD8⁺CD28⁻ cells further increased ($P < 0.0001$) at 9 d (Tabela 5.4). Betaine inclusion increased ($P < 0.0001$) the proportion of both CD8-CD28⁺ and CD8⁺CD28⁺ cells independent of the dose and age, but had no effect on the population of CD8⁺CD28⁻ cells (Tabela 5.4). On the other hand, the proportion of CD4⁺TCR γ β 1⁺ and CD4⁺TCR γ β 1⁻ cells increased ($P < 0.0001$) from hatch to 4 d of age and fell afterwards whilst CD4⁻TCR γ β 1⁺ increased ($P < 0.0001$) from hatch to 4 and 4 to 9 d of age (Tabela 5.4). The impact of betaine on the proportion of CD4⁺TCR γ β 1⁺; CD4⁺TCR γ β 1⁻ and CD4⁻TCR γ β 1⁺ populations depended upon age (Tabela 5.5). At 4 d of age, inclusion of 3 kg/tonne of betaine increased ($P < 0.0001$) the proportion of CD4⁻TCR γ β 1⁺; and inclusion of 5 kg/tonne increased ($P < 0.0001$) the proportion of both CD4⁺TCR γ β 1⁺ and CD4⁺TCR γ β 1⁻ cells but no effect of betaine inclusion was observed at 9 d of age. The proportion of both Mo⁺MHCII⁺ and Mo-

MHCII⁺ cells compared with total cells increased ($P < 0.0001$) in birds at 4 d of age while that of Mo+MHCII⁻ fell ($P < 0.0001$) between 4 and 9 days of age (Tabela 5.4). Age affected the CD4:CD8 ratio with the CD4⁺:CD8⁺ ratio falling ($P < 0.001$) between 4 and 9 d but no difference was observed between these ages and birds at hatch.

5.5 DISCUSSION

Gene expression for “Gap” junction protein (Claudin 1, Claudin 5 and Occludin) reduced within age, with a numerical difference between hatch and 4 days of age and a statistical ($P < 0.0001$) reduction between 4 and 9 days of age. At hatch, the paracellular junctions between enterocytes in the intestine is not well developed, allowing the paracellular transport of large molecules such as antibodies and nutrients from the yolk sac. This route of absorption reduces rapidly as these paracellular junctions tighten with age. The results from the present experiment supports this hypothesis as the gene expression for Claudin 1 and Claudin 5 and Occludin is greater between hatch and 4 d compared with birds at 9 d. This suggests a greater rate of production of these proteins to increase the strength of these junctions during the first few days post hatch when the junctions are at their loosest. The percentage of enterocyte membrane involved in “Tight” junctions increases in the 3 d after hatch (KARCHER & APPLGATE, 2008) strengthening the hypothesis that during these early days post hatch, the “Tight” junctions become more rigid.

Gene expression of Interleukin 2 also reduced with age but followed a different pattern, with a trend ($P < 0.06$) to increased gene expression between hatch and 4 d and reduced ($P < 0.0001$) afterwards. Interleukin 2 is a proinflammatory interleukin involved in the proliferation of lymphocytes by stimulating the transition of activated T cells from the G₁ to the S phase (HAN et al., 2010). An increase in Interleukin gene expression between hatch and 4 days of age may be related to a transitory proinflammatory environment as birds at that age may be reacting to the presence of digesta in the gastrointestinal tract. Most of the materials in the gastrointestinal tract, although not pathogenic, are capable of stimulating an immune response (HUGES, 2005). It is estimated that 3 % of the metabolised energy of the chicken could be directed towards the maintenance of a feed-induced immune response (KOGUT, 2017).

Until hatch, the gastrointestinal tract of chickens is empty, with absorption of fat and readily available proteins in the yolk sac taking place from the yolk sac membrane and the intestine directly to the blood (NOY & SKLAN, 2001). Once birds hatch and start to

consume feed with more complex nutrients, (more complex proteins, carbohydrates, fibre, etc) the intestine may react immunologically due to the presence of these nutrients in the lumen. Given at hatch the digestive tract of chicken is not completely adapted (GEYRA et al., 2001) to digest and absorb complexes nutrients presents in feed. The low digestibility and absorption at these early ages leads to an accumulation of nutrients at the gastrointestinal tract. These can result in a hyperosmotic solution that further contributes to a proinflammatory response (HUBERT et al., 2004; SCHWARTZ et al., 2009).

At four days of age, the inclusion of 1 and 3 kg/tonne of betaine in the diet reduced gene expression for Claudin 5 and Occludin, which suggests there has been a adaptation of the gastrointestinal tract and the demand for “Tight” junction formation has reduced somewhat. “Tight” junction formation is affected by enterocyte differentiation and replication (KARCHER & APPELEGATE, 2008). Previous research has shown that betaine inclusion increases villus heigh, modulates immune response and improves gastrointestinal tract recovery after a coccidial challenge (KETTUNEN et al., 2001; KLASING et al., 2002). As an osmoprotectant, betaine may help the gastrointestinal tract maintain regular more normal physiology even when facing a transitory period. At 9 days of age an interaction between the inclusion of fibre and betaine was observed; gene expression of Claudin 1, Claudin 5 and Occludin and Interleukin 2 were higher in broilers fed the low fibre diet and these were reduced by both betaine inclusion or fibre addition. Fibre interferes with the inflammatory responses in broilers but it is dependent upon the type of fibre used (TEIRLYNCK et al., 2009). Inclusion of soluble fibre increases inflammatory responses while insoluble fibre such as that used in this experiment reduce these inflammatory responses and stimulate villus growth (ADEDOKUN et al., 2012; REZAI et al., 2012).

Cytotoxic T cells are classified dependent of the presence of CD8 and CD28 in the external layer of their membrane. T cells that express both CD8 and CD28 are recognized as T cells in initial stages of activation or memory cells (CD8+CD28+) and T cells that express CD28 but not CD8 are recognized as non activated T cells (CD8-CD28+) (NABESHIMA et al., 2002). When T cells are activated for a long period of time, they lose the expression of CD28 and only maintain CD8 expression and are classified as activated cytotoxic T cells (CD8+CD28-). These cells are specific to target antigens and cannot replicate (NABESHIMA et al., 2002; PAWELEC et al., 2004).

The proportion of cytotoxic T cells in the leukocyte population increases between hatch and 4 days while a reduction in this percentage is observed for CD8-CD28+ and CD8+CD28+ between 4 and 9 d but CD8+CD28- further increases. The initial increase in

the population of cytotoxic T cells may be related to a maturation of the immune system. BEIRÃO et al. (2012) observed that under normal commercial conditions the levels of cytotoxic T cells increases in proportion to other T cells from day of age to 5 weeks, but that no such effect was observed in specific pathogen free birds and chickens raised in good hygiene conditions. This suggests that the changes noted in the present trial is related to an early maturation of the immune system and stresses how important these initial days are the development of the immune system. Betaine inclusion increases the proportion of CD8+CD28+ and CD8-CD28+ suggesting it aids in the development of the immune status but no effect was observed in the population of CD8+CD28- as the effect is of betaine is likely not related to specific antigens. Betaine inclusion has, however, been shown to reduce inflammatory responses in birds after a coccidial challenge (KLASING et al., 2002; KETTUNEN et al., 2001a).

Helper T cells are classified by the presence of CD4 and TCRvβ1 phenotypes. Helper T cells with CD4+ and TCRvβ1- (CD4+ TCRvβ1-) reaction are recognized as classical helper T cells and are responsible for activation of lymphocytes and organizing the adaptative immune response (CHAN et al., 1988). When TCRvβ1 is expressed (CD4+ TCRvβ1+) cells tends to migrate to the mucosa where they are responsible for IgA production (CIHAK et al., 1991). Other helper T cell that express TCRvβ1 but not CD4 are classified as cytotoxic mucosal T cells (CD4- TCRvβ1+) and have an important role in cellular immunity (LILLEHOJ, 1994). The proportion of CD4 cells in peripheral blood may vary dependent of the challenge of the bird (BEIRÃO et al, 2012). Birds challenged by *Salmonella spp* have reduced concentrations of CD4 and CD8 in the peripheral blood (FLORES et al., 2012) which actually increases their susceptibility to *Salmonella* infection (KAMALAVENKATESH et al., 2005). Inclusion of betaine increased the percentage of helper T cells at 4 days but not at 9 days of age. As the objective of the present trial was not to measure the response to a specific pathogen but to evaluate the immune system development in young birds, it could be concluded that betaine may play a role as a immune modulator during the transition period following hatch and improve immune competence as a result.

Monocytes (Mo+MHCII+) are precursors of macrophages in different tissues and express Mo marker in the membrane and are a bridge between the innate and adaptative immune responses. There are other cells that are not monocytes (Mo-) that may also be antigen presenter cells when expressing the MHCII marker in its membrane (Mo-MHCII+), but monocytes that do not present the MHCII marker act quite differently and reduce lymphocyte activity. These are classified as suppressors monocites (Mo+MHCII-)

(MASTERNAK & REITH, 2002). An increase in the proportion of both Mo+MHCII⁺ and MO-MHCII⁻ between hatch and 4 d of age and the reduction of suppressing monocytes (Mo+MHCII⁻) shows how the chick prepares for any immune response during these early stages. The betaine and fibre concentration in the diet did not affect the proportion of these populations.

The ratio between CD4 and CD8 cells may be used as an indicator of cell-mediated immune response (CHENG et al., 2001). Higher ratios of CD4:CD8 are usually an indication of immunocompetence (BEIRÃO et al., 2012), whilst reduced values are usually associated with challenging environmental factors, immunization or challenges such as bronchitis (BEIRÃO et al., 2012). Genetic selection for higher growth and egg production is also associated with a reduction in CD4:CD8 ratio (CHENG et al., 2012), supporting that genetic selection for higher performance will affect the immune response of the animals. In the present evaluation the CD4:CD8 ratio was reduced ($P<0.001$) at 9 d compared with 4 d but the results were still greater than 1.5 which is considered as a normal ratio (CHENG et al., 2012) when cellular immune mechanisms is not impaired and survivability is not compromised (LEVINSON & JAWETZ, 1996; REID & TERVIT, 1995). A reduction of the CD4:CD8 ratio can be associated with a natural exposure to germs in the environment as the ratio is reduced in birds raised commercially compared with birds raised specific pathogen free (FLORES et al., 2012). Some degree of immune challenge may be required to mature the immune system by increasing the relationship between helper and cytotoxic cells (BEIRÃO et al., 2012). Neither fibre concentration nor betaine inclusion affected this CD4:CD8 ratio. A lack of response in this study may be related to the maturation of the immune system being a result of exposure to a moderate bacterial challenge in the present environment but not a challenge by specific pathogens.

Betaine inclusion reduced expression of Claudin 5 and Occludin and increased the proportion of cytotoxic T cells and non activated helper T cells and helper T cells. These results suggests that betaine can be used as a modulator of the immune maturation during the early days post hatch, probably not by acting directly on these immune cells but helping the animal to support and adapt to this initial period and then reducing the inflammatory response associated with this adaptation process. This has been previously reported during coccidial challenges where digestibility is reduced as a result of intestinal damage and as a result there is an increase in nutrients in the digesta which increase digesta osmolarity (KETTUNEN et al., 2001a; KLASING et al., 2002). Fibre content had no effect on the gene expression and leukocyte population in broilers until 9 d of age. As fibre will affect the microbiota population in the gut, it is possible that the effect of fibre in the

immune status of broilers depends on a longer term effect in the gut. Such an effect may relate to fibre interacting with microbiota population and this in turn influencing cytokine gene expression (OAKLEY & KOGUT, 2016). In both cases, the fluctuation of the local gene expression for “Tight” junction proteins and leukocyte population shows that the gut development of broilers during the first days post hatch interact with a systemic immune system as the gut has a role as a sensory organ (FURNESS et al., 2013). It also shows that the immune system works as an integrator of local and systemic responses similar to what happens with the nervous system (TADA, 1997).

TABELA 5.3 – CLAUDIN 1, CLAUDIN 5, OCCLUDIN AND INTERLEUKIN 2 GENE EXPRESSION (LOG OF THE PROPORTION OF GAPDH EXPRESSION) ON JEJUNAL SAMPLES OF BROILERS AT 4 AND 9 DAYS OF AGE AND FED DIETS WITH DIFFERENT FIBRE CONCENTRATIONS AND BETAINES INCLUSION.¹

Treatment	Claudin 1			Claudin 5			Occludin		Interleukin 2	
Age (days)	4	9	4	9	4	9	4	9	4	9
Fibre										
Low ²	-0.145	-1.820	-1.008	-2.081	-0.918	-1.591	-0.482	-3.087		
High ³	-0.136	-2.526	-0.734	-2.768	-0.605	-2.143	-0.472	-3.769		
SEM	0.095	0.125	0.147	0.145	0.143	0.117	0.098	0.142		
Betaine (kg/tonne)										
0	-0.001	-1.277	-0.359 ^a	-1.680	-0.237 ^a	-1.354	-0.356	-2.255		
1	-0.228	-2.279	-1.161 ^b	-2.780	-1.095 ^b	-2.021	-0.500	-3.672		
3	-0.182	-2.678	-1.183 ^b	-2.632	-1.050 ^b	-1.918	-0.504	-4.005		
5	-0.153	-2.432	-0.774 ^{ab}	-2.660	-0.660 ^{ab}	-2.071	-0.549	-3.781		
SEM	0.135	0.178	0.208	0.204	0.203	0.166	0.139	0.203		
Fibre × Betaine										
Low		-0.134 ^a		-0.426 ^a		-0.304 ^a		-0.874 ^a		
1		-1.886 ^b		-2.455 ^b		-1.723 ^{bc}		-3.218 ^b		
3		-2.854 ^b		-2.618 ^b		-1.990 ^{bc}		-4.160 ^b		
5		-2.611 ^b		-2.932 ^b		-2.426 ^{bc}		-4.097 ^b		
High		-2.548 ^b		-2.934 ^b		-2.666 ^c		-3.635 ^b		
1		-2.934 ^b		-3.105 ^b		-2.518 ^{bc}		-4.126 ^b		
3		-2.502 ^b		-2.646 ^b		-1.846 ^{bc}		-3.850 ^b		
5		-2.176 ^b		-2.388 ^b		-1.564 ^{bc}		-3.466 ^b		
SEM		0.229		0.293		0.238		0.291		
P-value										
Fibre	0.928	0.001	0.167	0.002	0.111	0.002	0.940	0.001		
Betaine	0.658	<0.001	0.021	0.001	0.013	0.046	0.776	<0.001		
Fibre × Betaine	0.388	<0.001	0.945	<0.001	0.866	<0.001	0.604	<0.001		

^{a,b} Mean within columns with different superscripts are different ($P < 0.05$).

¹ Means and standard error of the mean represent 10 birds per treatment at 4 and 9 d of age.

² Corn-soybean meal diet

³ Corn-rice bran-soybean meal diet

TABELA 5.4 – LEUKOCYTE POPULATION DETERMINED BY FLOW CITOMETRY (LOG OF THE PROPORTION OF THE POPULATION) ON BLOOD SAMPLES OF BROIELRS AT HATCH, 4 AND 9 DAYS OF AGE AND FED DIETS WITH DIFFERENT FIBRE CONCENTRATION AND BETAIN INCLUSION.¹

Leukocytes	CD8- CD28+	CD8+ CD28+	CD8+ CD28- CD28-	Mo+ MHCII- MHCII-	Mo+ MHCII+ MHCII+	Mo- MHCII+ MHCII+	CD4- TCRvβ1+ TCRvβ1+	CD4+ TCRvβ1+ TCRvβ1+	CD4:CD8 Ratio
Age (days)									
Hatch	0.553 ^b	0.012 ^c	-1.425 ^c	-0.496 ^a	0.044 ^b	-0.266 ^b	-0.375 ^c	0.360 ^c	2.91
4	1.141 ^a	0.603 ^a	-0.399 ^b	-0.457 ^a	0.476 ^a	0.028 ^a	0.286 ^b	0.959 ^a	3.15
9	0.726 ^b	0.276 ^b	0.106 ^a	-0.839 ^b	0.430 ^a	0.007 ^a	0.382 ^a	0.563 ^b	2.01
SEM	0.028	0.029	0.031	0.053	0.032	0.034	0.028	0.028	0.15
Fibre									
Low ²	0.930	0.445	-0.139	-0.647	0.469	0.045	0.366	0.774	2.60
High ³	0.902	0.437	-0.111	-0.682	0.432	-0.015	0.308	0.756	2.49
SEM	0.026	0.027	0.031	0.052	0.031	0.033	0.026	0.027	0.14
Betaine (kg/tonne)									
0	0.824 ^b	0.286 ^b	-0.224	-0.801	0.431	-0.043	0.259	0.690	2.84
1	0.971 ^a	0.495 ^a	-0.164	-0.660	0.497	0.028	0.370	0.773	2.35
3	0.977 ^a	0.466 ^a	-0.079	-0.602	0.475	0.042	0.318	0.774	2.48
5	0.964 ^a	0.516 ^a	-0.112	-0.537	0.404	0.039	0.384	0.823	2.50
SEM	0.037	0.037	0.044	0.073	0.043	0.046	0.036	0.038	0.21
P-value									
Age	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.010	<0.001	<0.001	<0.001
Fibre	0.719	0.822	0.727	0.560	0.356	0.172	0.120	0.629	0.489
Betaine	0.010	<0.001	0.107	0.082	0.435	0.536	0.074	0.107	0.423
Fibre x Betaine	0.949	0.497	0.561	0.162	0.058	0.224	0.318	0.852	0.385
Fibre x Age	0.402	0.849	0.428	0.188	0.519	0.903	0.632	0.413	0.437
Age x Betaine	0.118	0.377	0.545	0.393	0.125	0.191	0.011	0.050	0.216
Fibre x Age x Betaine	0.671	0.684	0.962	0.974	0.712	0.962	0.611	0.688	0.082

^{a,b} Mean within columns with different superscripts are different ($P < 0.05$).

¹ Means and standard error of the mean represent 10 birds at hatch of age and 10 birds per treatment at 4 and 9 d of age.

² Corn-soybean meal diet

³ Corn-rice bran-soybean meal diet

TABELA 5.5 – INTERACTION BETWEEN BROILERS AGE AND BETAINA INCLUSION IN THE LEUKOCYTE POPULATION DETERMINED BY FLOW CITOMETRY (LOG OF THE PROPORTION OF THE POPULATION) ON BLOOD SAMPLES.¹

Leukocytes		CD4-TCRvβ1+	CD4+TCRvβ1+	CD4+TCRvβ1-
Age x Betaine				
4 d	0 kg/tonne			
	1	0.123 ^b	0.818 ^{bc}	0.414 ^{bc}
	3	0.318 ^{ab}	0.928 ^{ab}	0.519 ^{abc}
9 d	3	0.357 ^a	1.014 ^{ab}	0.597 ^{ab}
	5	0.336 ^{ab}	1.076 ^a	0.746 ^a
	0 kg/tonne	0.395 ^a	0.562 ^d	0.265 ^c
SEM	1	0.422 ^a	0.618 ^{cd}	0.354 ^{bc}
	3	0.279 ^{ab}	0.533 ^d	0.333 ^c
	5	0.431 ^a	0.569 ^d	0.284 ^c
SEM		0.051	0.053	0.058
P-value				
Age x Betaine		0.011	0.050	0.036

^{a,b} Mean within columns with different superscripts are different ($P < 0.05$).

¹ Means and standard error of the mean represent 10 birds per treatment at 4 and 9 d of age.

6 DISCUSSÃO

No momento da eclosão, aves apresentam vilosidades do trato gastrointestinal pouco desenvolvidas e com enterócitos pouco adaptados para a absorção de nutrientes complexos, o que pode ser caracterizado tanto por suas características morfológicas como pela baixa capacidade de produção de enzimas e expressão de proteínas de membrana necessárias para a absorção e o transporte de nutrientes (UNI et al., 2003; GEYRA et al., 2001). Além disso, as aves devem adaptar-se rapidamente à mudança no padrão de alimentação, passando de uma alimentação à base de proteínas de alta digestibilidade e fonte de gordura, presente no saco da gema, para uma alimentação com base em carboidratos e proteínas mais complexas (NOY e SKLAN, 2001).

O desenvolvimento e adaptação do trato gastrointestinal pode ser observado na presente avaliação pelo crescimento dos vilos e aumento da profundidade de cripta, além da redução no número de células em mitose no centro do vilos. Ao mesmo tempo, é possível observar principalmente no período logo após o início do consumo de alimento a presença de fatores relacionados com quadros de inflamação local, como o aumento no número de células caliciformes, aumento na secreção de ácido siálico e expressão gênica de interleucina 2 no tecido intestinal. Além disso, morfológicamente, é possível observar quadros como o aumento no número de villus fusionados (característica associada a outros quadros inflamatórios como desafios por coccidiose), e consequentemente, o aumento na espessura média dos vilos e assim evitando o aumento na área de absorção do trato gastrointestinal.

A redução desse quadro entre 4 e 14 dias demonstram, entretanto, que esse é um quadro transitório e possivelmente relacionado à dificuldade de digestão e absorção de nutrientes nesses primeiros dias pós eclosão. A baixa digestibilidade e absorção de nutrientes nesse período pós eclosão gerariam acúmulo de conteúdo no trato gastrointestinal, gerando aumento da osmolalidade intestinal e crescimento de microbiota, gerando os quadros próinflamatórios observados. À medida que o desenvolvimento do trato gastrointestinal ocorre, naturalmente aumenta a absorção de nutrientes e isso reduz a pressão inflamatória local o que está associado à redução da osmolalidade do conteúdo intestinal e também o quadro inflamatório.

Aves apresentam extensa rede de tecido linfóide associado ao trato gastrointestinal, especialmente na porção terminal desse trato, onde a microbiota é mais concentrada (YEGANI & KORVER, 2008). Ao mesmo tempo, respostas sistêmicas do

sistema imune ocorrem não apenas como resposta a agentes patogênicos mas também como maneira de manutenção de homeostase, de maneira semelhante ao que ocorre com o sistema nervoso (TADA, 1997). Na presente avaliação, proporção de CD8+CD28-, Mo+MHCII+, Mo-MHCII+ e CD4- TCRvβ1+ aumentaram entre a eclosão e 4 e/ou 9 dias de idade, demonstrando o processo de maturação do sistema imune. Por outro lado, a proporção de CD8-CD28+, CD8+CD28+; CD4+ TCRvβ1+ e CD4+ TCRvβ1- apresentam aumento de concentração em aves aos 4 dias de idade e posterior redução aos 9 dias de idade, o que corersponde ao mesmo período de resposta inflamatória local, o que demonstra a ação sensorial do trato gastrointestinal e como efeitos locais e sistemicos são associados.

Desta maneira, a formulação de ração fornecida para os animais pode afetar não somente o desenvolvimento do trato gastrointestinal mas também o desenvolvimento animal de maneira sistêmica. Na presente avaliação, animais alimentados com rações contendo betaina apresentaram menor numero de celulas em mitose no centro do vilo e maior altura de vilosidade e menor osmolalidade intestinal, demonstrando efeito positivo no desenvolvimento intestinal, além do menor numero de celulas caliciformes no vilo e secreção de ácido siálico e redução na espessura dos vilos, o que por sua vez estaria relacionado a um menor quadro inflamatório. Redução de efeitos inflamatórios em frangos alimentados com betaína já foram reportados anteriormente em frangos acometidos por coccidiose (KLASING et al., 2001; KETTUNEN ET AL., 2001a). Na presente avaliação, ainda, animais alimentados com betaina apresentaram menor expressão de claudina 5 e ocludina e maior proporção de CD8-CD28+; CD8+CD28+, demonstrando que o efeito da betaína no trato gastrointestinal afeta a imunidade de maneira sistêmica.

O nível de inclusão de fibra no alimento apresentou menor efeito no desenvolvimento intestinal e respostas imune, sendo que o principal efeito observado foi a redução no número de celulas caliciformes e o aumento na altura das vilosidades intestinais. Efeitos na concentração de leucócitos e expressão de proteínas de junção "Tight" foram menos pronunciados. É possível que o efeito da adição de fibra seja gerado a longo prazo já que a inclusão de fibra influenciará a população microbiana no trato gastrointestinal e esta população, então, afetando o status imune dos animais (OAKLEY & KOGUT, 2016). Efeitos como esse, no entanto, aconteceriam mais a longo prazo e é possível que o período da presente avaliação (entre 9 e 14 dias) não tenha sido longo o suficiente para que essas respostas tenham sido observadas.

7 CONCLUSÃO

Na presente avaliação confirmou-se que o trato gastrointestinal e o sistema imune de frangos de corte não apresentam-se totalmente desenvolvidos no momento da eclosão. O processo de desenvolvimento intestinal é intenso após eclosão, caracterizado pela especialização de enterócitos nas vilosidades intestinais, aumento de vilosidade e expansão da área de absorção. Nesses primeiros dias, observou-se o aumento da expressão gênica de interleucinas pró-inflamatórias maior número células caliciformes com consequente aumento na secreção de ácido siálico, que podem afetar negativamente a digestão e absorção de nutrientes atrasando o crescimento. A inclusão de betaína auxiliou a manutenção do crescimento, desenvolvimento e adaptação dos enterócitos frente a esse período de flutuação da osmolaridade intestinal, acelerando o processo de adaptação intestinal e também a modulação do sistema imune enquanto a inclusão de ração com alta concentração de fibra estimulou o desenvolvimento da mucosa intestinal evidenciando o efeito físico da alimento sobre a mucosa intestinal. A inclusão de betaína pode ser um potencial substituto à utilização de dietas com ingredientes mais digeríveis para frangos de corte.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Pressões governamentais e da opinião pública tem levado produtores de proteínas animais, especialmente produtores de frango de corte à reduzir a utilização de antibióticos como promotores de crescimento nos sistemas de produção. Tal mudança no sistema de produção faz com que se aumente a influência de outras áreas sobre respostas imunes e com consequências para a produtividade em geral. Especificamente, a nutrição passa a ter maior importância não apenas como mecanismo de fornecimento de nutrientes para os animais mas como esses nutrientes são oferecidos e utilizados e como essa oferta afeta a estrutura do trato gastrointestinal e a microbiota intestinal. Esses fatores se tornam ainda mais importantes em momentos de transição nutricional e períodos de adaptação como os primeiros dias após a eclosão.

Na presente avaliação foi possível observar como essa alimentação inicial e as estratégias nutricionais utilizadas como o nível e tipo de fibra da dieta e a presença de betaína afeta não apenas o desenvolvimento do trato gastrointestinal mas também afeta respostas imunes sistêmicas. O período pós eclosão pode ser classificado por um período de transição já que se observaram mudanças intensas como por exemplo o aumento das vilosidades intestinais e área de absorção, redução no número de células em replicação. Entretanto, observa-se também um quadro característico de agressão e resposta inflamatória como o aumento no número de vilos fusionados, aumento de células caliciformes e redução da secreção de ácido siálico após os 4 dias de idade. A redução na expressão de interleucina e variação na população de leucócitos demonstra que essa resposta local gera também respostas sistêmicas.

O fornecimento de betaína e fibra na ração afetou o processo de desenvolvimento intestinal, estimulando o desenvolvimento das vilosidades intestinais e, no caso do fornecimento de 5kg/ton de betaína, aumentando a área de absorção. O fornecimento de betaína ainda reduziu o número de enterócitos em replicação nos vilos do trato gastrointestinal, suportando que sua presença acelera o processo de desenvolvimento intestinal enquanto tanto o fornecimento 5kg/ton de betaína quanto a formulação de ração com alta concentração de fibra reduziu o número de células caliciformes e a secreção de ácido siálico. O aumento da população de linfócitos T auxiliares quando do fornecimento de betaína demonstram que essa resposta local também gera um quadro sistêmico.

Esses resultados reforçam os conceitos do trato gastrointestinal trabalhar como um alicerce do sistema imune e o conceito do sistema imune como não apenas um sistema

reativo à desafios sanitários e patogênicos mas também parte de um sistema integrado de manutenção da homeostase do organismo. Dessa maneira, reforçam a importância que avaliações nutricionais não se restrinjam apenas ao trato gastrointestinal mas que na realidade abordem o animal de uma forma integrada.

Novos estudos podem ser desenvolvidos abordando outras áreas ou estratégias nutricionais como utilização de enzimas ou níveis nutricionais distintos. Ainda é possível avaliar respostas locais e sistêmicas em animais durante outro período de desenvolvimento ou passando por desafios específicos como respostas à coccidiose ou períodos de estresse calórico agudo, constante ou intermitente. Por último, respostas e avaliações semelhantes podem ser desenvolvidas em outras espécies animais que passam por processo de adaptação nutricional e variação de padrão nutricional semelhante como leitões ao nascimento e ao desmame ou poedeiras em transição entre o período de recria e produção.

9 REFERÊNCIAS

ADEDOKUN, S.A.; AJUWON, K.M.; ROMERO, L.F.; ADEOLA, O. Ileal endogenous amino acid losses: Response of broiler chickens to fiber and mild coccidial vaccine challenge. **Poultry Science**, v.91, p. 899-907, 2012.

ADEOLA, O.; XUE, P.C.; COWIESON, A.J.; AJUWON, K.M. Basal endogenous losses of amino acids in protein nutrition research for swine and poultry. **Animal Feed Science and Technology**, v.221, p. 274-283, 2016.

ADIBMORADI, M.; NAVIDSHAD, B.; JAHROMI, M.F. The effect of moderate levels of finely ground insoluble fibre on intestine morphology, nutrient digestibility and performance of broiler chickens. **Italian Journal of Animal Science**, v.15, p. 310-317, 2016.

AHMED, A.S. Performace and immune response of broiler chicks as affected by different levels of total dissolved solids in drinking water under hot arid environments. **Animal Production Science**, v. 53, p. 322-327, 2013.

ALFIERI, R. R.; CAVAZZONI, A.; PETRONINI, P.G.; BONELLI, M.A.; CACCAMO, A.E.; BORGHETTI, A.F.; WHEELER, K.P. Compatible osmolytes modulate the response of porcine endothelial cells to hypertonicity and protect them from apoptosis. **Journal of Physiology**, v. 540, p. 499-508, 2002

ALIREZAEI, M.; REZA GHEISARI, H.; REZA RANJBAR, V.; HAJIBEMANI, A. Betaine: a promising antioxidant agent for enhancement of broiler meat quality. **British Poultry Science**, v. 53, p. 699-707, 2012.

ANDREWARTHA, S.J.; TAZAWA, H.; BURGGREN, W.W. Hematocrit and blood osmolality in developing chicken embryos (*Gallus gallus*): In vivo and in vitro regulation. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 179, p. 142-150, 2011.

ANDRIGUETTO, J.M.; PERLY, L.; MINARDI, I.; GAMAEL, A.; FLEMMING, J.S. SOUZA, G.A.; BONA FILHO, A. **Nutrição Animal: As bases e os fundamentos da nutrição animal**. 4.ed. São Paulo: Editora Nobel, 1981

ANNISON, G.; CHOCT, M. Anti-nutritive activities of cereal non-starch polysaccharides in broiler diets and strategies minimizing their effects. **World`s Poultry Science Journal**,v. 47, p. 232-242, 1991.

APPLEGATE, T.J.; DIBNER, J.J.; KITCHELL, M.L.; UNI, Z.; LILBURN, M.S. Effect of turkey (*Meleagris gallopavo*) breeder hen age and egg size on poult development. 2. Intestinal villus growth, enterocyte migration and proliferation of the turkey poult. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 124, p. 381-389, 1999

ARAKAWA, T.; TIMASHEFF, S.N. The stabilization of proteins by osmolytes. **Biophysics**, v.47, p. 411-414, 1985

ASHRAF, S.; ZANEB, H.; IJAZ, A.; SOHAIL, M.U.; MUTI, S.; USMAN, M.M.; IJAZ, S.; REHMAN, H. Effect of dietary supplementation of prebiotics and probiotics on intestinal microarchitecture in broilers reared under cyclic heat stress. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 93, p. 68-73, 2013

BALLOU, A.; ALI, R.; MENDOZA, M.; ELLIS, J.; HASSAN, H.; CROOM, W.; KOCI, M. Development of the chick microbiome: How early exposure influences future microbial diversity. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 3, p. 2, 2016.

BANKS, W.J. **Histologia Veterinária Aplicada**. 2.ed. São Paulo: Editora Manole Ltda, 1992.

BARBOSA, N.A.A.; SAKOMURA, N.K.; LONGO, F.A.; DA SILVA, E.P.; BONATO, M.A.; FERNANDES, J.B.K. Effect of dietary betaine supplementation on the performance, carcass yield, and intestinal morphometrics of broilers submitted to heat stress. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 15, p. 105-112, 2013

BASKAKOV, I.; WANG, A.; BOLEN, D.W. Trimethylamine-N-Oxide counteract urea effects on rabbit muscle lactate dehydrogenase function: A test of the counteraction hypothesis. **Biophysical Journal**, v. 74, p. 266-2673, 1998.

BEDFORD, M.R.; COWIESON, A.J. Exogenous enzymes and their effects on intestinal microbiology. **Animal Feed Science and Technology**, v. 173, p. 76-85, 2012.

BEDFORD, M.R.; WALK, C.L. The use of exogenous enzymes to improve feed efficiency in pigs. In: WISEMAN, J. **Achieving sustainable production of pig meat**. Cambridge: Burleigh Dodds Science Publishing, 2017.

BEIRÃO, B.; FÁVARO JR., C.; NAKAO, L.; CARON, L.; ZANATA, S.; MERCADANTE, A. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 145, p. 32-41, 2012.

BELAY, T.; WIERNUSZ, C.J.; TEETER, R.G. Mineral balance and urinary and fecal mineral excretion profile of broilers housed in thermoneutral and heat-distressed environments. **Poultry Science**, v. 71, p. 1043-1047, 1992.

BLALOCK, J.E. The immune system as a sensory organ. **The Journal of Immunology**, v.132, p.1067-1070, 1984

BOLOGNA-MOLINA, R.; MOSQUEDA-TAYLOR, A.; MOLINA-FRECHERO, N.; MORI-ESTEVEZ, A.D.; SANCHEZ-ACUNA, G. Comparison of the value of PCNA and Ki-67 as markers of cell proliferation in ameloblastic tumors. **Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal**, v. 18, p. 174-179, 2013.

BOWLUS, R.D.; SOMERO, G.N. Solute compatibility with enzymes function and structure: rationales for the selection of osmotic agents and end-product of anaerobic metabolism in marine invertebrates. **Journal of Experimental Zoology**, v. 208, p. 137-152, 1979

BRIDLE, B.; JULIAN, R.; SHEWEN, P.; VAILLANCOURT, J.; KAUSHIK, A. T lymphocyte subpopulations diverge in commercially raised chickens. **The Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 70, p. 183-190, 2006.

BROER, S. Amino acid transport across mammalian intestinal and renal epithelia. **Physiology Review**, v.88, p.249-286, 2008.

BUSTIN, S.; BENES, V.; GARSON, J.; HELLEMANS, J.; HUGGETT, J.; KUBISTA, M.; MUELLER, R.; NOLAN, T.; PFAFFL, M.; SHIPLEY, G.; VANDESOMPELE, J.; WITTEWER, C. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR experiments. **Clinical Chemistry**, v. 55, p. 611-622, 2009.

CAZABAN, C.; MASFERRER, N.; PASCUAL, R.; ESPADAMALA, M.; COSTA, T.; GARDIN, Y. Proposed bursa of fabricius weight to body weight ratio standard in commercial broilers. **Poultry Science**, v. 94, p. 2088-2093, 2015.

CELI, P.; COWIESON, A.J.; FRU-NJI, F.; STEINERT, R.E.; KLUENTER, A.M.; VERLHAC, V. Gastrointestinal functionality in animal nutrition and health: new opportunities for sustainable animal production. **Animal Feed Science and Technology**, v. 234, p. 88-100, 2017.

CHAN, M.; CHEN, C.; AGER, L.; COOPER, M. Identification of the avian homologues of mammalian CD4 and CD8 antigens. **Journal of Immunology**, v. 140, p. 2133-2138, 1988.

CHAUDHRI, O.; SMALL, C.; BLOOM, S. Gastrointestinal hormones regulating appetite. **Philosophical Transactions of the Royal Society**, v. 361, p. 1187-1209, 2006.

CHEN, J.; TELLEZ, G.; RICHARDS, J.D.; ESCOBAR, J. Identification of potential biomarkers for gut barrier failure in broiler chickens. **Frontiers in Veterinary Sciences**, v. 2, p. 14, 2015.

CHENG, H.; EICHER, S.; CHEN, Y.; SINGLETON, P.; MUIR, W. Effect of genetic selection for group productivity and longevity on immunological and hematological parameters of chickens. **Poultry Science**, v. 80, p. 1079-1086, 2001.

CHEVALIER, N.R.; FLEURY, V.; DUFOUR, S. ; PROUX-GILLARDEAUX, V. ; ASNACIOS, A. Emergence and development of gut motility in the chicken embryo. **PLoS ONE**, v. 12, n. 2, e0172511, 2017

CHOCT, M. Feed non-starch polysaccharides: Chemical structure and nutritional significance. **Feed Milling International**, v. 191, p. 13-26, 1997

CHOCT, M. Feed non-starch polysaccharides for monogastric animals: classification and function. **Animal Production Science**, v. 55, p. 1360-1366, 2015

CHOCT, M.; DERSJANT-LI, Y.; MCLEISH, J.; PEISKER, M. Soy oligosaccharides and soluble non-starch polysaccharides: A review of digestion, nutritive and anti-nutritive effects in pigs and poultry. **Asian Australasian Journal of Animal Science**, v. 23, p. 1386-1398, 2010

CHOCT, M.; HUGHES, R.J.; WANG, J.; BEDFORD, M.R.; MORGAN, A.J.; ANNISON, G. Increased small intestinal fermentation is partly responsible for the anti-nutritive activity of non-starch polysaccharides in chickens. **British Poultry Science**, v. 37, p. 609-621, 1996.

CHOCT, M.; SINLAE, M.; AL-JASSIM, R.A.M.; PETTERSSON, D. Effects of xylanase supplementation on between-bird variation in energy metabolism and the number of *Clostridium perfringis* in broiler fed a wheat-based diet. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.57, p. 1017-1021, 2006.

CIHAK, J.; HOFFMANN-FEZER, G.; ZIEGLER-HEIBROCK, H.; STEIN, H.; KASPERS, B.; CHEN, C.; COOPER, M.; LOSCH, U. T cells expressing the V beta 1 T-cell receptors are required for IgA production in the chicken. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 88, p. 10951-10955, 1991.

COBB-VANTRESS INC, Cobb 500 SF Breeder Management and Cobb 500 Broiler performance. Disponível em: <<http://www.cobb-vantress.com/products/cobb-500>>. Acesso em: 04/05/2017

CONTE, A.J.; TEIXEIRA, A.S.; FIALHO, E.T.; SCHOULTEN, N.A.; BERTECHINI, A.G. Efeito da fitase e xylanase sobre o desempenho e as características ósseas de frangos de corte alimentados com dietas contendo farelo de arroz. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, p. 1147-1156, 2003

CONTE, T.; DEMONT-CAULET, N.; GHAZI, A.; RICHARME, G. Thermoprotection by glycine betaine and choline. **Microbiology**, v.145, p.2543-2548, 1999.

CORTHESEY, B.; GASKINS, H.R.; MERCENIER, A. Cross-talk between probiotic bacteria and the host immune system. **The journal of Nutrition**, v. 137, p. 781S-790S, 2007.

COWIESON, A.J.; ACAMOVIC, T.; BEDFORD, M.R. The effects of phytase and phytic acid on the loss of endogenous amino acids and minerals from broiler chickens. **British Poultry Science**, v. 45, p. 101-108, 2004.

CRAIG, S.A.S. Betaine in human nutrition. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 80, p. 539-549, 2004

DADALT, J.C. Avaliação do valor nutricional do farelo de arroz desfitinizado em dietas para suínos em crescimento. **Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2012

DE MESSCHALCK, C.; EECKHAUT, V.; MAERTENS, L.; DE LANGE, L.; MARCHAL, L.; NEZER, C.; DE BAERE, S.; CROUBELS, S.; DAUBE, G.; DEWULF, J.; HAESEBROUCK, F.; DUCATELLE, R.; TAMINAU, B.; VAN IMMERSEEL, F. Effect of xylo-oligosaccharides on broiler chicken performance and microbiota. **Journal of Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, p. 5880-5888.

DE VRIES, S. Fiber fermentation in pigs and poultry. Sense and nonsense of its manipulation. **Tese de Doutorado**, Wageningen University, 2016

DIBNER, J.J.; KNIGHT, C.D.; KITCHELL, M.L.; ATWELL, C.A.; DOWNS, A.C.; IVEY, F.J. Early feeding and development of the immune system in neonatal poultry. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 7, p. 425-436, 1998

DILGER, R.N.; GARROW, T.A.; BAKER, D.H. Betaine can partially spare choline in chicks but only when added to diets containing a minimal level of choline. **The Journal of Nutrition**, v. 137, p. 2224-2228, 2007.

DING, S.T.; LILBURN, M.S. Characterization of changes in yolk sac and liver lipids during embryonic and early posthatch development of turkey poults. **Poultry Science**, v. 75, p. 478-483, 1996

DOS SANTOS, T.T.; CORZO, A.; KIDD, M.T.; MCDANIEL, C.D.; TORRES FILHO, R.A.; ARAUJO, L.F. Influence of in ovo inoculation with various nutrients and egg size on broiler performance. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 19, p. 1-12, 2010

EKLUND, M.; BAUER, E.; WAMATU, J.; MOSENTHIN, R. Potential nutritional and physiological functions of betaine in livestock. **Nutritional Research Reviews**, v. 18, p. 31-48, 2005.

EMMERT, J.L.; GARROW, T.A.; BAKER, D.H. Hepatic betaine-homocysteine methyltransferase activity in the chicken is influenced by dietary intake of sulfur amino acids, choline and betaine. **The Journal of Nutrition**, v. 126, p. 2050-2058, 1996

ENGLYST, K.N.; LIU, S.; ENGLYST, H.N. Nutritional characterization and measurement of dietary carbohydrates. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 61, p. S19-S39, 2007.

ESTEVE-GARCIA E.; MACK, S. The effect of DL-Methionine and betaine on growth performance and carcass characteristics in broilers. **Animal Feed Science and Technology**, v. 87, p. 85-93, 2000.

FAIR, J.; TAYLOR-MCCABE, K.; SHOU, Y.; MARRONE, B. Immunophenotyping of chicken peripheral blood lymphocyte subpopulations: individual variability and repetability. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 125, p. 268-273, 2008.

FAO **Quality assurance for animal feed analysis laboratories**. 14.ed. Rome: FAO, 2011.

FERNANDEZ-RUBIO, C.; ORDÓÑEZ, C.; ABAD-GONZÁLEZ, J.; GARCIA-GALLEGO, A.; PILAR HONRUBIA, M.; JOSE MALLO, J.; BALAÑA-FOUCE, R. Butyric acid-based feed additives help protect broiler chickens from *Salmonella enteritidis* infection. **Poultry Science**, v.88, p. 843-948, 2009.

FLORES, F.; LOVATO, M.; WILSMANN, C.; GAZONI, F.; SILVEIRA, F.; CARON, L.; BEIRÃO, B. Comportamento de células do Sistema imune frente ao desafio dom *Salmonella Enteritidis* em aves tratadas e não tratadas com ácidos orgânicos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, p. 495-502, 2012.

FOSTER, C.; AMADO, E.M.; SOUZA, M.M.; FREIRE, C.A. Do osmoregulators have lower capacity of muscle water regulation than osmoconformers? A study on decapod crustaceans. *Journal of Experimental Zoology*, v. 313, p. 80-94, 2009.

FU, Q.; LENG, Z.X.; DING, L.R.; WANG, T.; WEN, C.; ZHOU, Y.M. Complete replacement of supplemental DL-Methionine by betaine affects meat quality and amino acid content in broilers. ***Animal Feed Science and Technology***, v. 212, p. 63-69, 2016.

FURNESS, J.; RIVERA, L.; CHO, H.; BRAVO, D.; CALLAGHAN, B. The gut as a sensory organ. ***Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology***, v. 10, p. 729-740, 2013.

GARCIA, R.A.; STEIN, S.D.; PIAZZA, G.J. Poultry blood preservation and the impact of preservation on flocculant activity. ***Applied Engineering in Agriculture***, v. 30, p. 445-453, 2014.

GEYRA, A.; UNI, Z.; SKLAN, D. Enterocytes dynamics and mucosal development in the posthatch chick. ***Poultry Science***, v. 80, p.776-782, 2001.

GHOLAMIANDEHKORDI, A.R.; TIMBERMONT, L.; LANCKRIET, A.; VAN DEN BROECK, W.; PEDERSEN, K.; DEWULF, J.; PASMANS, F.; HAESEBROUCK, F.; DUCATELLE, R.; VAN IMMERSEEL, F. Quantification of gut lesions in a subclinical necrotic enteritis model. ***Avian Pathology***, v. 36, p. 375-382, 2007.

GOMES, G.A. Nutrição pós eclosão ode frangos de corte. ***Dissertação de Mestrado***, Universidade de São Paulo, 2007.

GONNELLI, M., STRAMBINI, G.B. No effect of trimethylamine N-oxide on the internal dynamics of the protein native fold. ***Biophysical Chemistry***, v. 89, p. 77-85, 2001.

GOODLAND, R.A.; LENTON, W.; GHATEI, M.A.; ADRIAN, T.E.; BLOOM, S.R.; WRIGHT, N.A. Proliferative effects of fibre on the intestinal epithelium: relationship to gastrin, enteroglucagon and PYY. ***Gut***, v. 28, p. 221-226, 1987

GRAF, D.; KURZ, A.K.; REINEHR, R.; FISCHER, R. KURCHEIS, G.; HAUSSINGER, D. Prevention of bile acid-induced apoptosis by betaine in rat liver. **Hepatology**, v. 36, p. 829-839, 2002

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 9.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997.

HALEVY, O.; GEYRA, A.; BARAK, M.; UNI, Z.; SKLAN, D. Early posthatch starvation decreases satellite cell proliferation and skeletal muscle growth in chicks. **Journal of Nutrition**, v. 130, n. 4, p. 858-864, 2000.

HAN, A.Y.; ZHANG, M.H.; ZUO, X.L.; ZHENG, S.S.; ZHAO, C.F.; FENG, J.H.; CHENG, C. Effect of acute heat stress on calcium concentration, proliferation, cell cycle, and interleukin-2 production in splenic lymphocytes from broilers chickens. **Poultry Science**, v.89, p. 2063-2070, 2010.

HASHEMIPOUR, H.; KERMANSHAHI, H.; GOLIAN, A.; VELDKAMP., T. Effect of thymol and carvacrol feed supplementation on performance, antioxidant enzyme activities, fatty acid composition, digestive enzyme activities, and immune response in broiler chickens. **Poultry Science**, v. 92, p. 2059-2069, 2013.

HOFFMAN, J.R.; RATAMESS, N.A.; KANG, J.; RASHTI, S.L.; FAIGENBAUM, A.D. Effect of betaine supplementation on power performance and fatigue. **Journal of the International Society of Sports Nutrition**, v. 6, article 7, 2009.

HOODA, S.; MATTE, J.J.; VASANTHAN, T.; ZIJLSTRA, R.T. Dietary purified oat B-glucan reduces peak glucose absorption and portal insulin release in portal-vein catheterized grower pigs. **Live Science**, v. 134, p. 15-17, 2010.

HOPFER, U.; NELSON, K.; PERROTTO, J.; ISSELBACHER, K.J. Glucose transport in isolated brush border membrane from rat small intestine. **The Journal of Biological Chemistry**, v.248, p.25-32, 1973.

HUBERT, A.; CAULIEZ, B.; CHEDEVILLE, A.; HUSSON, A.; LAVOINNE, A. Osmotic stress, a proinflammatory signal in Caco-2 cells. **Biochimie**, v. 86, p. 533-541, 2004.

HUGES, R. An integrated approach to understand gut function and gut health of chickens. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, v.14, p. S27, 2005

IJI, P.A.; SAKI, A.; TIVEY, D.R. Body and intestinal growth of broiler chicks on a commercial starter diet. 1. Intestinal weight and mucosal development. **British Poultry Science**, v. 42, p. 505-513, 2001.

IZYDORCZKY, M.S.; BILIADERIS, C.G. Cereal arabinoxylans: advances in structure and physicochemical properties. **Carbohydrate polymers**, v. 28, p. 33-48, 1995.

JIMENEZ-MORENO, E.; GONZALEZ-ALVORADO, J.M.; GONZALEZ-SERRANO, A.; LAZARO, R.; MATEOS, G.G. Effect of dietary fiber and fat on performance and digestive traits of broilers from one to twenty-one days of age. **Poultry Science**, v. 88, p. 2562-2574, 2009.

JOURDAIN, G.W.; DEAN, L.; ROSEMAN, S. The sialic acids: A periodate-resorcinol method for the quantitative estimation of free sialic acids and their glycosides. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 246, p.430-435, 1971.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 8.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1995.

KALMAR, I.D.; VERSTEGEN, M.W.A.; VANROMPAY, D.; MAENNER, K.; ZENTEK, J.; IBEN, C.; LEITGEB, R.; SCHIAVONE, A.; PROLA, L.; JANSSENS, G.P.J. Efficacy of dimethylglycine as feed additive to improve broiler production. **Livestock Science**, v. 164, p. 81-86, 2014.

KAMALAVENKATESH, P.; VAIRAMUTHU, S.; BALACHANDRAN, C.; MURALI-MANOVAR, B.; DHINAKAR-RAJ, G. Immunopathological effect of the mycotoxins cyclopiazonic acid and T-2 toxin on broiler chicken. **Mycopathologia**, v. 159, p. 273-279, 2005.

KARCHER, D.; APPELEGATE, T. Survey of enterocyte morphology and tight junction formation in the small intestine of avian embryos. **Poultry Science**, v. 87, p. 339-350, 2008.

KEMPSON, S.A.; ZHOU, Y.; DANBOLT, N.C. The betaine/GABA transporter and betaine: roles in brain, kidney and liver. **Frontiers in Physiology**, v. 5, article 159, 2014.

KETTUNEN, H.; PEURANEN, S.; TIIHONEN, K. Betaine aids in the osmoregulation of duodenal epithelium of broiler chicks, and affects the movement of water across the small intestinal epithelium in vitro. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**, v. 129, p. 595-603, 2001a.

KETTUNEN, H.; PEURANEN, S.; TIIHONEN, K.; SAARINEN, M. Intestinal uptake of betaine in vitro and the distribution of methyl groups from betaine, choline and methionine in the body of broiler chicks. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**, v. 128, p. 269-278, 2001b.

KETTUNEN, H.; TIIHONEN, K.; PEURANEN, S.; SAARINEN, M.T.; REMUS, J.C. Dietary betaine accumulates in the liver and intestinal tissue and stabilizes the intestinal epithelial structure in healthy and coccidia-infected broiler chicks. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**, v. 130, p. 759-769, 2001c.

KIDD, M.T.; FERKET, P.R. GARLICH, J.D.; Nutritional and osmoregulatory functions of betaine. **World's Poultry Science Journal**, v. 53, p. 125-139, 1997

KISIELINSKI, K.; WILLIS, S.; PRESCHER, A.; KLOSTERHALTEN, B.; SCHUMPELICK, V. A simple new method to calculate small intestine absorptive surface in the rat. **Clinical and Experimental Medicine**, v. 2, p. 131-135, 2002.

KLASING, K.C.; ADLER, K.L.; REMUS, J.C.; CALVERT, C.C. Dietary betaine increased intraepithelial lymphocytes in the duodenum of coccidian-infected chicks and increases functional properties of phagocytes. **The Journal of Nutrition**, v. 132, p. 2274-2282, 2002.

KNUDSEN, K.E.B. Fiber and nonstarch polysaccharide content and variation in common crops used in broiler diets. **Poultry Science**, v. 93, p. 2380-2393, 2014

KOGUT, M. Issues and consequences of using nutrition to modulate the avian immune response. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 26, p. 605-612, 2017.

KOGUT, M.H.; LOWRY, V.K.; MOYES, R.B.; BOWDEN, L.L.; BOWDEN, R.; GENOVESE, K.; DELOACH, J.R. Lymphokine-augmented activation of avian heterophils. **Poultry Science**, v.77, p.964-971, 1998.

KRAS, R.V.; KESSLER, A.M.; RIBEIRO, A.M.L.; HENN, J.D.; BOCKOR, L.; SBRISSIA, A.F. Effect of dietary fiber, genetic strain and age on digestive metabolism of broiler chickens. **Brazilian Journal of poultry Science**, v. 15, p. 83-90, 2013.

KUMAR, V.; SINHA, A.K.; MAKKAR, H.P.S.; DE BOECK, G.; BECKER, K. Dietary roles of non-starch polysaccharides in human nutrition: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 52, p. 899-935, 2012.

KUNICKI, T.J.; NEWMAN, P.J. Synthesis of analogs of human platelets membrane glycoprotein IIa-IIIa complex by chicken peripheral blood thrombocytes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 82, p. 7319-7323, 1985

LARSEN, F.M.; MOUGHAN, P.J.; WILSON, M.N. Dietary fibre viscosity and endogenous protein excretion at the terminal ileum of growing rats. **The Journal of Nutrition**, v. 123, p. 1898-1904, 1993.

LEITE, P.R.S.C.; LEANDRO, N.S.M.; STRINGHINI, J.H.; CAFÉ, M.B.; GOMES, N.A.; JARDIM FILHO, R.M. Desempenho de frangos de corte e digestibilidade de rações com sorgo ou milho e complexo enzimático. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, p. 280-286, 2011

LEVER, M.; SLOW, S.; PER M.U. Betaine. In: HERMANN, W. **Vitamins in prevention of human diseases**. Berlin: Walter de Gruyter GmbH, 2010.

LEVINSON, W.; JAWETZ, E. **Medical microbiology and immunology**. 1.ed. Stamford: Appleton and Lance, 1996

LILBURN, M.S.; LOEFFLER, S. Early intestinal growth and development of poultry. **Poultry Science**, v. 94, p. 1569-1576, 2015.

LILLIHOJ, H. Analysis of *Eimeria acervulina*-induced changes in the intestinal lymphocyte subpopulations in two chickens strains showing different levels of susceptibility to coccidiosis. **Research in Veterinary Science**, v. 56, p. 1-7, 1994.

LIPINSKI, K.; SZRAMKO, E.; JEROCH, H.; MATUSEVICIUS, P. Effects of betaine on energy utilization in growing pigs – A review. **Annals of Animal Science**, v. 12, p. 291-300, 2012.

LIU, N.; RU, Y.J.; LI, F.D.; COWIESON, A.J. Effect of diet containing phytate and phytase on the activity and messenger ribonucleic acid expression of carbohydrase and transporter in chickens. **Journal of Animal Science**, v. 86, p. 3432-3439, 2008.

MACARI, M.; FURLAN, R.L.; GONZALES, E. **Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte**. 2. ed. Jaboticabal: FUNEP/UNESP, 2002.

MAGWEDERE, K.; MUKARATIRWA, S. Evaluation of intestinal pH and osmolality levels in rats (*Rattus norvegicus*) and chickens (*Gallus gallus*) experimentally infected with *Trichinella zimbabwensis*. **International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine**, v. 6, p. 166-174, 2008.

MAIORKA, A.; SANTIN, E.; DAHLKE, F.; BOLELI, I.C.; FURLAN, R.L.; MACARI, M. Posthatching water and feed deprivation affect the gastrointestinal tract and intestinal mucosa development of broiler chicks. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 12, p. 483-492, 2003

MANEEWAN, B.; YAMAUCHI, K. Recovery of duodenal villi and cell in chickens refed protein, carbohydrate and fat. **British Poultry Science**, v. 46, p. 415-423, 2005.

MASTERNAK, K.; REITH, W. Promoter-specific functions of CIITA and the MHC class II enhanceosome in transcriptional activation. **The EMBO Journal**, v. 21, p. 1379-1388, 2002.

MATTHEWS, J.O.; SOUTHERN, L.L. The effect of dietary betaine in *Eimeria acervulina*-infected chicks. **Poultry Science**, v. 79, p. 60-65, 2000

MATTHEWS, J.O.; SOUTHERN, L.L.; BIDNER, t.d.; PERSICA, M.A. Effects of betaine, pen space, and slaughter handling methods on growth performance, carcass traits, and pork quality of finishing barrows. **Journal of Animal Science**, v. 79, p. 967-974, 2001

MCDEVITT, R.M.; MACK, S.; WALLIS, L.R. Can betaine partially replace or enhance the effect of methionine by improving broiler growth and carcass characteristics? **British Poultry Science**, v. 41, p. 473-480, 2000

MOORE, K.L.; PERSAUD, T.V.N. **Embriologia Clínica**. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994.

MORAN JR, E.T. Nutrition of the developing embryo and hatchling. **Poultry Science**, v. 86, p. 1043-1049, 2007

MULDER, I. E.; SCHMIDT, B.; STOKES, C.R.; LEWIS, M.; BAILEY, M.; AMINOV, R.I.; PROSSER, J.I.; GILL, B.P.; PLUSKE, J.R.; MAYER, C.D.; MUSK, C.C.; KELLY, D. Environmentally-acquired bacteria influence microbial diversity and natural innate immune responses at gut surfaces. **BMC Biology**, v.7, p. 79, 2009,

MURAWSKA, D.; KLECZEK, K.; WAWRO, K.; MICHALIK, D. Age-related changes in the percentage content of edible and non-edible components in broiler chickens. **Asian-Australasian Journal of Animal Science**, v. 24, p. 532-539, 2011

MUSHTAQI, M.M.H.; PASHA, T.N.; MUSHTAQI, T.; PARVIN, R. Electrolytes, dietary electrolyte balance and salts in broilers: an update review on growth performance, water intake and litter quality. **World`s Poultry Science Journal**, v. 69, p. 789-802.

NABESHIMA, S.; MURATA, M.; KIKUCHI, K.; IKEMATSU, H.; KASHIWAGI, S.; HAYASHI, J. A reduction in the number of peripheral CD28+CD8+ T cells in the acute phase of influenza. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 128, p. 339-346, 2002.

NAKANO, K.; NAKANO, T.; AHNM, D.U.; SIM, J.S. Sialic acid content in the chicken egg and tissue. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 74, p. 601-606, 1994.

NASCIMENTO, G.M.; LEANDRO, N.S.M.; CAFÉ, M.B.; STRINGHINI, J.H.; ANDRADE, M.A.; MARTINEZ, K.L.A.; MELLO, H.H.C.; MASCARENHAS, A.G. Performance and intestinal characteristics of broiler chicken fed diet with glutamine in the diet without anticoccidials agents. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.15, p. 637-648, 2014.

NEYRINCK, A.M.; VAN HEE, V.F.; PIRONT, N.; DE BACKER, F.; TOUSSAINT, O.; DELZENNE, N.M. Wheat-derived arabinoxylan oligosaccharides with prebiotic effect increase satietogenic gut peptides and reduce metabolic endotoxemia in diet-induced obese mice. **Nutrition and Diabetes**, v. 2, e28, 2012

NOY, Y; SKLAN, D. Yolk and exogenous feed utilization in the posthatch chick. **Poultry Science**, v.80, p. 1490-1495, 2001

OAKLEY, B.; KOGUT, M. Spatial and temporal changes in the broiler cecal and fecal microbiomes and correlations of bacterial taxa with cytokine gene expression. **Frontiers in Veterinary Science**, v.3, p. 11, 2013.

OBST, B.S.; DIAMOND, J. Ontogenesis of intestinal nutrient transport in domestic chickens (*Gallus gallus*) and its relation to growth. **The Auk**, v. 109, p. 451-464, 1992.

ONYANGO, E.M.; ASEM, E.K.; ADEOLA, O. Phytic acid increases mucin endogenous amino acid losses from gastrointestinal tract of chickens. **British Journal of Nutrition**, v. 101, p. 836-842, 2009.

PARK, S.O.; KIM, W.K. Effects of betaine on biological functions in meat-type ducks exposed to heat stress. **Poultry science**, v. 96, p. 1212-1218, 2017.

PAWELEC, G.; AKBAR, A.; CARUSO, C.; EFFROS, R.; GRUBECK-LOEBENSTEIN, B.; WIKBY, A. Is immunosenescence infectious? **Trends in immunology**, v. 25, p. 406-410, 2004.

PFAFFL, M. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 29, p. E45, 2001.

PILLAI, P.B.; FANATICO, A.C.; BLAIR, M.E.; EMMERT, J.L. Homocysteine remethylation in broilers fed surfeit choline or betaine and varying levels and sources of methionine from eight to twenty-two days of age. **Poultry Science**, v. 85, p. 1729-1736, 2006.

PLANO C.M.; DI MATTEO, A.M. **Atlas de Patología de la Incubación del Pollo**. 1.ed. Lima: Guzlop Editoras, 2014.

PLUSKE, J.R.; THOMPSON, M.J.; ATWOOD, C.S.; BIRD, P.H.; WILLIAMS, I.H.; HARTMANN, P.E. Maintenance of villus height and crypt depth, and enhancement of disaccharide digestion and monosaccharide absorption, in piglets fed on cows' whole milk after weaning. **British Journal of Nutrition**, v.76, p.409-422, 1996

POWELL, S.; BIDNER, T.D.; SOUTHERN, L.L. The interactive effects of glycine, total sulfur aminoacids, and lysine supplementation to corn-soybean meal diets on growth performance and serum uric acid and urea concentration in broilers. **Poultry Science**, v. 88, p.1407-1412, 2009

RAHMATNEJAD, E.; SAKI, E.E. Effect of dietary fibres on small intestine histomorphology and lipid metabolism in young broiler chickens. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 100, p. 665-672, 2016.

RAKHA, A.; SAULNIER, L.; AMAN, P.; ANDERSSON, R. Enzymatic fingerprinting of arabinoxylan and B-glucan in triticale, barley and tritodeum grains. **Carbohydrate Polymers**, v.90, p.1226-1234, 2012

RAMA RAO, S.V.; RAJU, M.V.L.N.; PANDA, A.K.; SAHARIA, P.; SUNDER, G.S. Effect of supplementing betaine on performance, carcass traits and immune responses in broiler

chicken fed diets containing different concentrations of methionine. **Asian-Australasian Journal of Animal Science**, v. 24, p. 662-669, 2011.

RATRIYANTO, A.; MOSENTHIN, R.; BAUER, E.; EKLUND, M. Metabolic, osmoregulatory and nutritional function of betaine in monogastric animals. **Asian-Australasian Journal of Animal Science**, v. 22, p.1461-1476, 2009.

REID, G.; TERVIT, H. Sudden infant death syndrome (SIDS): immunoglobulins and hypoxia. **Medical Hypotheses**, v. 44, p. 202-206, 1995.

REZAEI, M.; KARIMI TORSHIZI, M.A.; ROUZBEHAN, Y. The influence of different levels of micronized insoluble fiber on broiler performance and litter moisture. **Poultry Science**, v. 90, p. 2008-2012, 2011.

REZENDE, P.M. Relação de aminoácidos sulfurados: lisina digestíveis e diferentes fontes de betaina na alimentação de frangos de corte. **Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal de Goiás, 2015.

ROCHA, C. Impacto de diferentes alimentos sobre a estrutura morfológica intestinal e digestibilidade dos nutrientes em frangos. **Tese de Doutorado**, Universidade Federal do Paraná, 2014.

ROCHA, C.; DURAU, J.F.; BARRILLI, L.N.E.; DAHLKE, F.; MAIORKA, P.; MAIORKA, A. The effect of raw and roasted soybeans on intestinal health, diet digestibility, and pancreas weight of broilers. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 23, p. 71-79, 2014.

RODER, P.V.; GEILLINGER, K.E.; ZIETEK, T.S.; THORENS, B.; KOEPESELL, H.; DANIEL, H. The role of SGLT1 and GLUT2 in intestinal glucose transport and sensing. **PLoS ONE**, v.9, n.2, e89977, 2014

ROSTAGNO, H.S.; PACK, M. Can betine replace supplemental dl-methionine in broiler diets? **Journal of Applied Poultry Research**, v. 5, p. 150-154, 1996.

ROSTAGNO, H.S. **Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais** 4 ed. Viçosa: Departamento de Zootecnia, 2017.

ROSTAGNO, H.S. **Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais** 3 ed. Viçosa: Departamento de Zootecnia, 2011.

SACRAINE, A.; SVIHUS, B.; DENSTADLI, V.; IJI, P.A.; CHOCT, M. The effect of insoluble fibre and intermittent feeding on gizzard development, gut motility, and performance in broiler chickens. **Australian Poultry Science Symposium**, v. 23, p. 24-27, 2012.

SAKOMURA, N.K.; BARBOSA, N.A.A.; DA SILVA, E.P.; LONGO, F.A.; KAWAUCHI, I.M.; FERNANDES, J.B.K. Efeito da suplementação de betaine em dietas de frangos de corte em condições de termoneutralidade. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 8, p. 336-341, 2013

SANTOS, V.L.P.; FRANCO, C.R.C.; VIGGIANO, R.L.L.; SILVEIRA, R.B.; CANTAO, M.P.; MANGILLI, O.C.; VEIGA, S.S.; GREMSKI, W. Structural and ultrastructural description of the venom gland of *Loxosceles intermedia* (brown spider). **Toxicon**, v. 38, p. 265-285, 2000.

SATSU, H; MIYAMOTO, Y; SHIMIZU, M. Hypertonicity stimulates taurine uptake and transporter gene expression in Caco-2 cells. **Biochimica et biophysica Acta**, v. 1419, p. 89-96, 1999

SAYED, M.A.; DOWNING, J. The effects of water replacement by oral rehydration fluids with or without betaine supplementation on performance, acid-base balance, and water retention of heat-stressed broiler chickens. **Poultry Science**, v. 90, p. 157-167, 2011

SCHWAHN, B.C.; HAFNER, D.; HOHLFELD, T.; BALKENHOL, N.; LARYEA, M.; WENDEL, U. Pharmacokinetics of oral betaine in healthy subjects and patients with homocystinuria. **British Journal of Clinic Pharmacology**, v. 55, p. 6-13, 2003.

SCHWARTZ, L.; ABOLHASSANI, M.; POOYA, M.; STEYAERT, J.M.; WERTZ, X.; ISRAEL, M.; GUAIS, A.; CHAUMET-RIFFAUD, P. Hyperosmotic stress contributes to mouse colonic inflammation through the methylation of protein phosphatase 2A. **American Journal of Physiology: Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 295, p. G934-G941, 2008.

SCHWARTZ, L.; GUAIS, A.; POOYA, M.; ABOLHASSANI, M. Is inflammation a consequence of extracellular hyperosmolarity? **Journal of inflammation**, v.6, p. 21, 2009.

SHENG, Q.K.; YANG, L.Q.; ZHAO, H.B.; WANG, X.L.; WANG, K. effects of low level water-soluble pentosan, alkaline-extractable pentosans, and xylanase on growth and development of broiler chicks. **Asian-Australasian Journal of Animal Science**, v. 26, p. 1313-1319, 2013

SIDDONS, R.C.; COATES, M.E. The influence of the intestinal microflora on disaccharidase activities in the chick. **British Journal of Nutrition**, v. 27, p. 101-112, 1972.

SILJANDER-RASI, H.; PEURANEN, S.; TIIHONEN, K.; VIRTANEN, E.; KETTUNEN, H.; ALAVIUKOLA, T.; SIMMINS, P.H. Effect of equi-molar dietary betaine and choline addition on performance, carcass quality and physiological parameters of pigs. **Animal Science**, 76, p.55-62, 2003)

SILVA, J.R.L.; RABELLO, C.B.; JUNIOR, W.M.D.; LUDKE, M.C.M.M.; BARROSO, J.F.; FREITAS, C.R.G.; CAMPELO FILHO, E.V.B.; AQUINO, L.M. Efeito da forma física e do programa alimentar na fase pré-inicial sobre desempenho e características de carcaça de frangos de corte. **Acta Scientifica**, v. 26, p. 543-551, 2003.

SKLAN D.; HEIFETZ, S.; HALEVY, O. Heavier chicks at hatch improves marketing body weight by enhancing skeletal muscular growth. **Poultry Science**, v. 82, p. 1887-1786, 2003.

SOBECKI, M.; MROUJ, K.; CAMASSES, A.; PARISIS, N.; NICOLAS, E.; LLERES, D.; GERBE, F.; PRIETO, S.; KRASINKA, L.; DAVID, A.; EGUREN, M.; BIRLING, M.C.; URBACH, S.; HEM, S.; DEJARDIN, J.; MALUMBRES, M.; JAY, P.; DULIC, V.; LAFONTAINE, D.L.J.; FEIL, R.; FISCHER, D. The cell proliferation antigen Ki-67 organises heterochromatin. **eLife**, v. 5, p. e13722, 2016.

SOMMER, F.; BACKHED, F. The gut microbiota – master of host development and physiology. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, p. 227-238, 2013.

SOUTHWELL, B.R. Staging of intestinal development in the chick embryo. **The Anatomical Record Part A**, v. 288, p. 909-920, 2006

STABEL, T.; BOLIN, S.; PESCH, B.; RAHNER, T. A simple and rapid flow cytometric method for detection of porcine cell surface markers. **Journal of Immunological Methods**, v. 245, p. 147-152, 2000.

STEF, L.; DRINCEANU, D.; JULEAN, C.; STEF, D.; PANDUR, C. Changes of intestine dimension determined by barley and wheat-based non starch polysaccharides (NSP) in broilers. **Scientific Papers: Animal Science and Biotechnologies**, v. 44, p. 118-124, 2011.

SVIHUS, B.; JUVIK, E.; HETLAND, H.; KROGDAHL, A. Causes for omprovement in nutritive value of broiler chicken diets with whole wheat instead of ground wheat. **British Poultry Science**, v. 45, p. 55-60, 2004.

SWIATKIEWICZ, S.; ARCZEWSKA-WLOSEK, A.; JOZEFIK, D. Feed enzymes, probiotic, or chitosan can improve the nutritional efficacy of broiler chicken diets containing a high level of distillers dried grains with solubles. **Livestock Science**, v.163, p.110-119, 2014

TADA, T. The immune system as a supersystem. **Annual Reviews in Immunology**, v. 15, p. 1-13, 1997

TAKAHASHI, T. Flow behavior of digesta and the absorption of nutrients in the gastrointestinal. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, v. 57, p. 265-273, 2011

TEIRLYNCK, E.; BJERRUM, L.; EECKHAUT, V.; HUYGEBART, G.; PASMANS, F.; HAESABROUCK, F.; DEWULF, J.; DUCATELLE, R.; VAN IMMERSEEL, F. The cereal type in feed influences gut wall morphology and intestinal immune cell infiltration in broiler chickens. **British Journal of Nutrition**, v. 102, p. 1453-1461, 2009.

THEANDER, O.; AMAN, P.; WESTERLUND, E.; ANDERSSON, R. PETERSSON, D. Total dietary fiber determined as neutral sugar residues, uronic acid residues, and Klason lignin

(the Uppsala method): Collaborative study. **Journal of AOAC Internals**, v. 78, p. 1030-1044, 1995

THOMASON, R.T.; BADER, D.M.; WINTERS, N.I. Comprehensive timeline of mesodermal development in the quail small intestine. **Developmental Dynamics**, v. 241, p. 1678-1694, 2012

THWAITES, D.T.; ANDERSON, C.M.H. Deciphering the mechanisms of intestinal imino (and amino) acids transport: the redemption of SLC36A1. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1768, p. 179-197, 2007.

TIZARD, I.R. **Imunologia Veterinária – Uma Introdução**. 5. ed. São Paulo: Editora Roca LTDA, 1998.

ULLUWISHEWA, D.; ANDERSON, R.; MC NABB, W.C.; MOUGHAN, P.J.; WELLS, J.M.; ROY, N.C. Regulation of tight junction permeability by intestinal bacteria and dietary components. **The Journal of Nutrition**, v. 141, p. 769-776, 2011

UNI, Z.; GANOT, S.; SKLAN, D. Posthatch development of mucosal function in the broiler small intestine. **Poultry Science**, v. 77, p. 75-82, 1998.

UNI, Z.; PLATIN, R.; SKLAN, D. Cell proliferation in chicken intestinal epithelium occur both in the crypt and along the villus. **Journal of Comparative Physiology**, v. 168, p. 241-247, 1998.

UNI, Z.; NOY, Y.; SKLAN, D. Posthatch development of mucosal function in the broiler small intestine. **Poultry Science**, v.77, p.75-82, 1998

UNI, Z.; NOY, Y.; SKLAN, D. Posthatch development of small intestinal function in the poult. **Poultry Science**, v.78, p.215-222, 1999

UNI, Z.; GEYRA, A.; BEN-HUR, H.; SKLAN, D. Small intestinal development in the young chick : crypt formation and enterocyte proliferation and migration. **British Poultry Science**, v. 41, p. 544-551, 2000.

UNI, Z.; GAL-GARBER, O.; GEYRA, A.; SKLAN, D.; YAHAV, S. Change in the growth and function of chick small intestine epithelium due to early thermal conditioning. **Poultry Science**, v. 80, p. 438-445, 2001.

UNI, Z.; TAKO, E.; GAL-GARBER, O.; SKLAN, D. Morphological, molecular and functional changes in the chicken small intestine of the late-term embryo. **Poultry Science**, v. 82, p. 1747-1754, 2003.

VAJRESWARI, A.; NARAYANAREDDY, K. Effect of dietary fats on erythrocyte membrane lipid composition and membrane-bound enzyme activities. *Metabolism*, v. 41, p. 352-358, 1992.

VANDEPLAS, S.; DUBOIS DAUPHIN, R.; THIRY, C.; BECKERS, Y.; WELLING, G.W.; THONART, P.; THEWIS, A. Efficiency of a *Lactobacillus plantarum*-xylanase combination on growth performances, microflora populations, and nutrient digestibilities of broilers infected with *Salmonella typhimurium*. **Poultry Science**, v.88, p. 1643-1654, 2009

VAN DER KAMP, J.W.; ASP, N.G.; MILLER JONES, J.; SCHAAFSMA, G. **Dietary fibre – Bio-active carbohydrates for food and feed**. 1. ed. The Netherlands: Wageningen Academic Publishers, 2004.

VENEMA, K. Role of gut microbiota in the control of energy and carbohydrate metabolism. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 13, p. 432-438, 2010.

WALDROUP, P.W.; MOTI, M.A.; YAN, F.; FRITTS, C.A. Effects of betaine and choline on response to methionine supplementation to broiler diets formulated to industry standards. **Journal Applied Poultry Research**, v. 15, p. 58-71, 2006.

WILLING, B.P.; VAN KESSEL, A.G. Intestinal microbiota differentially affect brush border enzyme activity and gene expression in neonatal gnotobiotic pig. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 93, p. 586-595, 2009.

YAHAV, S.; STRASCHNOW, A.; PLAVNIK, I.; HURWITZ, S. Blood system response of chickens to change in environmental temperature. **Poultry Science**, v. 76, p. 627-633, 1997.

YANCEY, P.H.; CLARK, M.E.; HAND, S.C. Living with water stress: evolution of osmolyte systems. **Science**, v. 217, p. 1214-1222, 1982.

YEGANI, M.; KORVER, D.R. Factors affecting intestinal health in poultry. **Poultry Science**, v. 87, p. 2052-2063, 2008

YEOMAN, C.J.; CHIA, N.; JERALDO, P.; SIPOS, M.; GOLDENFELD, N.D.; WHITE, B. The microbiome of the chicken gastrointestinal tract. **Animal Health Research Reviews**, v. 13, p. 89-99, 2012.